THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR
DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

par

Jean STURM
Ingénieur E.N.S.C.S.
Attaché de recherches au C.N.R.S.

RELAXATION CHIMIQUE PAR SAUT DE TEMPÉRATURE. MISE AU POINT DE L'APPAREIL ET APPLICATION A L'ÉTUDE CINÉTIQUE DES INTERACTIONS DE L'ADN AVEC LA TILORONE ET L'HYDROXYSTILBAMIDINE

Soutenue le 21 Juin 1974 devant la Commission d'Examen

MM. H. BENOIT Président
M. DAUNE Examinateur
C. HELENE Examinateur
R. ZANA Examinateur

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548025_0007

ERRATA

Pages

15 dernière ligne : supprimer un des "lorsque"

17 relations I,3,6 : première ligne, termes de droite : rajouter "+ k_{-2}"

23 dernière ligne du texte ; remplacer "I,2,27" par "I,2,28"

24 texte entre les relations I,3,18 et I,3,19 : supprimer "La relation I,2,28 donne alors" et remplacer par "D'où :"

25 texte entre les relations I,3,21 et I,3,22 : remplacer "I,2,29" par "I,2,30"

35 ligne 8 : remplacer "relation I,2,26" par "relation I,2,27"

59 ligne 5 : remplacer 5.000 par 500

91 supprimer les lignes 10 à 16

97 première ligne après tableau : les mesures à r élevé

115 figure III,17 légende : (●) r = 0,1

149 ligne 3 : = $(1 - \frac{3}{2} \cos^2 \chi)$ ...

152 Tableau IV,3, légende : remplacer $V_V + 2V_H$ par $V_V + 2H_V$

170 §B, deuxième ligne : ... of 7.10^{-4} M or 10^{-1} M glycerol, ...

186 ligne 17 : see Figure 9 in ref. 2)

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR
DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

par

Jean STURM

Ingénieur E.N.S.C.S.
Attaché de recherches au C.N.R.S.

RELAXATION CHIMIQUE PAR SAUT DE TEMPÉRATURE. MISE AU POINT DE L'APPAREIL ET APPLICATION A L'ÉTUDE CINÉTIQUE DES INTERACTIONS DE L'ADN AVEC LA TILORONE ET L'HYDROXYSTILBAMIDINE

Soutenue le 21 Juin 1974 devant la Commission d'Examen

MM. H. BENOIT Président
M. DAUNE Examinateur
C. HELENE Examinateur
R. ZANA Examinateur

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
STRASBOURG

Edition Décembre 1973

Président : Professeur G. OURISSON
Vice-Présidents : Professeur A. CHAUMONT
Professeur G. LAUSTRIAT
Secrétaire Général : G. KIEHL

PROFESSEURS, MAITRES DE CONFERENCES, DIRECTEURS ET MAITRES DE RECHERCHE DES U.E.R. RESPONSABLES DES DOCTORATS ES-SCIENCES

Doyens honoraires : A. KIRRMANN – P. LACROUTE – H.J. MARESQUELLE – J.H. VIVIEN – G. MILLOT.
Professeurs honoraires : P. de BEAUCHAMP – L. BOISSELET – H. CARTAN – G. CERF – C. CHABAUTY – A. CHRETIEN – J. DENY – Ch. EHRESMANN – Mlle S. GILLET – A. HEE – R. HOCART A. KIRRMANN – G. LEMEE – P. L'HERITIER – A. LICHNEROWICZ – A. MAILLARD H.J. MARESQUELLE – L. NEEL – J. PARROD – Ch. SADRON – F. TERROINE – H. VILLAT – H. WEISS – Et. WOLFF – J. YVON.
Maître de Conférences honoraire : R. WEIL.

Professeurs

J.	ROTHE	Physique du Globe
P.	LACROUTE	Astronomie
J.H.	VIVIEN	Zool. et Embryol. expérimentale
S.	GORODETZKY	Phys. Gén. et Physique Nucléaire
L.	SACKMANN	Mécanique des Fluides
M.	PEREY	Chimie Nucléaire
S.	GOLDSZTAUB	Minéralogie et Pétrographie
P.	JOLY	Biologie Générale
H.	BENOIT	Physicochimie macromoléculaire
P.	CUER	Physique générale et Phys. Corp.
G.	MILLOT	Géologie et Paléontologie
R.	LECOLAZET	Physique du Globe
H.	SAUCIER	Minéralogie
R.	ROHMER	Chimie Minérale
A.	GAGNIEU	Botanique
F.	STUTINSKY	Physiologie Générale
B.	WURTZ	Chimie Biologique
J.	BRENET	Electrochimie
J.P.	EBEL	Chimie Biologique
G.	OURISSON	Chimie
A.	COCHE	Physique Nucléaire
R.	CERF	Physique Générale
J.	FRENKEL	Mathématiques
A.	DELUZARCHE	Chimie
R.	ARMBRUSTER	Physique
A.	ROCHE	Physique du Globe
L.	HIRTH	Microbiologie
A.	FUCHS	Mécanique rationnelle
A.	GALLMANN	Physique
P.	MIALHE	Physiologie animale
D.	MAGNAC	Physique
M.	DAUNE	Biophysique
J.P.	ADLOFF	Chimie Nucléaire
D.	BERNARD	Méthode math. de la Physique
E.	DANIEL	Physique expérimentale
P.	CHEVALLIER	Physique
G.	REEB	Topologie
J.	WUCHER	Physique
M.	BRINI	Chimie
H.	DURANTON	Botanique
R.	WEISS	Chimie
P.	FEDERLIN	Chimie
J.P.	SCHWING	Chimie
M.	SIESKIND	Physique
G.	MONSONEGO	Physique Théorique
C.	WIPPLER	Physicoch. des Hts Polymères industriels
G.	WEILL	Physique
A.	CLAUSS	Chimie
E.	FOLLENIUS	Zoologie
J.	LUCAS	Géologie
J.J.	THIEBOLD	Biologie animale
G.	GLAESER	Mathématiques
J.H.	WEIL	Chimie Biologique
D.	FOATA	Mathématiques
H.	DANAN	Physique Atom. et Physique du Solide
X	FERNIQUE	Mathématiques
F.	GAUTIER	Physique
G.	SUTTER	Physique Electronique
V.	AVANISSIAN	Analyse Supérieure
F.	LACROUTE	Biologie Végétale
J.P.	EBERHART	Minéralogie
J.M.	LEHN	Chimie
Cl.	ROBERT	Physique
F.	BECKER	Physique mathématique
Fr.	SCHALLER	Biologie Générale
Fr.	GAULT	Chimie organique
M.	GOUNOT	Botanique
J.	DEHAND	Chimie Minérale
C.	GODBILLON	Mathématiques
J.	ROUX	Botanique
R.	VOLTZ	Physique Théorique
A.	MICHARD	Géologie
Y.	BOULANGER	Chimie Biologique
J.J.	RIEHL	Chimie
R.	GERARD	Mathématiques
M.	DAIRE	Chimie Phys. ind. et Sc. des Matériaux
G.	DUNOYER de SEGONZAC	Géologie
J.P.	JOUANOLOU	Mathématiques
Cl.	DELLACHERIE	Mathématiques
Ph.	RICHARD	Physiologie animale
J.	FARAUT	Mathématiques
J.P.	RAMIS	Mathématiques générales

Professeurs Associés

A. BANDERET (E.A.H.P.) – H. HAKEN (Phys.) – A.H.M. LEVELT (Math.) – O. LAUDAL (Math.) – R. MILNE (Microbiologie) – L.R. NARANAYAN (Chimie) – C. VIRGILI (Géologie).

Professeurs Conventionnés

V. HOENIG (Médecine). C. KIWIET de JONGE (Géographie)

Maîtres de Conférences Conventionnés

J.P. BAUER (Psychologie) – P. CAHN (Psychologie) – N. KONO (Mathématiques) – A. TABOURET-KELLER (Psychologie)

.../.....

Maîtres de Conférences et Chargés d'Enseignement

M.	GROSMANN	Physique
Ph.	ROPARTZ	Psycho-Physiologie
G.	SOLLADIE	Chimie Organique
P.	BENVENISTE	Physiologie végétale
D.	VIAUD	Mathématiques
R.	KIRSCH	Zoologie
J.	SOMMER	Chimie appliquée
A.	HINSCHBERGER	Chimie Physique
J.	BROSSAS	Chimie Macromoléculaire
M.	LEROY	Chimie
C.	PESKINE	Mathématiques
M.J.	SCHWING	Chimie Physique
J.Cl.	BERNIER	Chimie Générale
J.J.	FRIED	Mécanique des Fluides
J.	LEITE-LOPEZ	Physique Nucl & Corpusculaire

Maître de Conférences adjoint

J.	SITTLER	Géologie

Professeurs et Maîtres de Conférences du C.U.H.R.

P.	TAGLANG	Physique
J.P.	DONNET	Chimie Physique
R.	WEY	Chimie
J.	STREITH	Chimie
J.	MARTINET	Mathématiques
G.	SCHIFFMANN	Mathématiques
J.	FAURE	Chimie Physique
Fr.	SCHMITT	Physique
Chr.	WINTER	Physique
A.	JAEGLE	Physique
A.	KALT	Chimie Physique
R.	LUTZ	Mathématiques
J.	LAFAYE MR	Physicochimie atom. - ionique
B.	SIFFERT MR	Cristallo. et Mi néralogie

Professeurs et Maîtres de Conférences des I.U.T.

Strasbourg

Ch.	TANIELLIAN	Chimie
M.	GROSS	Chimie

Mulhouse

G.	PERNY	Physique Appliquée
R.	MANQUENOUILLE	Mathématiques Appliquées
G.	METZGER	Electronique
B.	LAVILLE St-MARTIN	Physique Appliquée
R.	STEIN	Physique Electronique

Directeurs et Maîtres de Recherche

J.F.	BIELLMANN	DR	Chimie
P.	BOUVEROT	DR	Physiol. respiratoire
P.	DEJOURS	DR	Physiol. respiratoire
A.	KNIPPER	DR	Phys. nucl. et corpus.
A.	KOVACS	DR	Physicochim. macromol.
J.	MARCHAL	DR	Physicochim. macromol.
P.A.	MEYER	DR	Mathématiques
A.J.P.	MEYER	DR	Physique
J.	MEYER	DR	Botanique
C.	MIALHE	DR	Physiologie
S.	NIKITINE	DR	Physique
A.	PETROVIC	DR	Médecine
P.	REMPP	DR	Physicochim. macromol.
A.	SKOULIOS	DR	Physicochim. macromol.
R.	WEIL	DR	Minéralogie
A.	ZUCKER	DR	Physique Théorique
F.	BECK	MR	Physique nucléaire
J.P.	BECK	MR	Physiologie
M.	BONHOMME	MR	Géologie
H.	BRAUN	MR	Physique corpusculaire
S.	CANDAU	MR	Physique
M.	CHAMPAGNE	MR	Biophysique
J.P.	COFFIN	MR	Phys. nucl. et corpus.
A.	CORET	MR	Physique
M.	CROISSIAUX	MR	Physique nucléaire
M.	DARTIGUENAVE	MR	Chimie Minérale
J.	DOUBINGER	MR	Géologie
S.	EL KOMOSS	MR	Physique
J.P.	VON ELLER	MR	Géologie
J.M.	FRANCK-NEUMANN	MR	Chimie organ. biol.
E.	FRANTA	MR	Physicochimie moléculaire
J.M.	FRIEDT	MR	Physicochim. atom.-ioniq
A.	FRIDMANN	MR	Physique corpusculaire
Y.	GALLOT	MR	Physicochim. macromol.
J.B.	GRUN	MR	Physique
G.	KAUFFMANN	MR	Chimie
A.	LLORET	MR	Physique corpusculaire
Th.	MULLER	MR	Physique
G.	MUNSCHY	MR	Physique
M.	NAUCIEL-BLOCH	MR	Physique des Solides
M.	PATY	MR	Physique Corpusculaire
R.	PFIRSCH	MR	Botanique
A.	PORTE	MR	Physiologie
J.	POUYET	MR	Biophysique
J.	RINGEISEN	MR	Physique
J.P.	ROTH	s/Dir. C.R.M.	Physicochim. macromol.
F.	SCHEIBLING	MR	Spectrométrie nucléaire
N.	SCHULTZ	MR	Physique nucléaire
P.	SIFFERT	MR	Phys. rayon.&Electron.n
Cl.	SITTLER	MR	Géologie
Cl.	STRAZIELLE	MR	Physicochim. macromol.
M.	SUFFERT	MR	Basses Energies
Y.	TARDY	MR	Géologie
R.	VAROQUI	MR	Physicochim. macromol.
A.	VEILLARD	MR	Chimie
A.	WAKSMANN	MR	Neurochimie
G.	WALTER	MR	Phys. rayon.& Electron.n
J.P.	WENIGER	MR	Zoologie
J.	WITZ	MR	Biologie Cellulaire
R.	WOLFF	MR	Chimie
R.	ZANA	MR	Physicochim. macromol.
J.P.	ZILLINGER	MR	Physique

A mes parents,

A ma femme,

A Monsieur Raoul ZANA,

A Monsieur Michel DAUNE.

Ce travail a été effectué au Centre de Recherches sur les Macromolécules, à Strasbourg, sous les auspices du Centre National de la Recherche Scientifique.

Qu'il me soit permis de témoigner ici ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur Henri BENOIT, Directeur de ce Laboratoire, pour l'accueil qu'il m'a réservé et les moyens qu'il a mis à ma disposition. Je le remercie de m'avoir fait l'honneur de présider la Commission d'Examen.

Monsieur Raoul ZANA, Maître de Recherches au CNRS, qui a dirigé ce travail, m'a fait bénéficier de sa grande expérience dans les études cinétiques tout en me laissant de grandes libertés dans le choix des orientations de recherches. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance.

Monsieur le Professeur Michel DAUNE a suscité une partie de ce travail. Il m'a largement fait bénéficier de sa vaste expérience et ses nombreuses suggestions m'ont été d'un grand profit. L'amitié qu'il me témoigne depuis de nombreuses années et son enthousiasme communicatif pour la recherche sont en partie responsables de mon goût pour les sciences. Qu'il soit très vivement remercié.

Je suis heureux de pouvoir rendre hommage à Monsieur Claude HELENE, Directeur du Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans qui s'est intéressé à ce travail. Il n'a jamais manqué de venir s'enquérir de l'état d'avancement de mon travail et de me faire profiter de ses larges connaissances lors de ses passages à Strasbourg. Je le remercie d'avoir accepté de participer au Jury.

Monsieur le Professeur Gilbert WEILL m'a guidé dans les expériences d'orientation des macromolécules sous champ électrique ; je lui en suis très reconnaissant.

Mes remerciements s'adressent également à tous les membres du service de Cinétique Rapide du CRM, en particulier à Messieurs Jacques LANG et Christian TONDRE ; ils m'ont aidé au cours de cette thèse, tant par leurs suggestions que par leurs critiques.

Je voudrais également associer à ce travail tous ceux et celles qui m'ont assuré leur précieux concours et spécialement Monsieur LIBEYRE, qui a traduit concrètement mes désirs électroniques, et Messieurs MEYER et PISTER qui ont respectivement réalisé les parties mécaniques et électroniques de l'appareil de saut de température.

Enfin, je ne voudrais pas oublier la serviabilité de Mademoiselle Marthe HOFFMANN, secrétaire de la Chorale A Coeur Joie Allegro, pour le grand soin qu'elle a mis à la présentation de cette thèse.

*****

TABLE DES MATIERES

		Page
INTRODUCTION		I
CHAPITRE I -	RELAXATION CHIMIQUE ET MECANISMES REACTIONNELS	1
I. 1	Le concept de relaxation chimique	1
I. 2	Les équations de la relaxation chimique	3
	A. Définition du temps de relaxation	3
	B. Cas d'un mécanisme réactionnel à plusieurs étapes	6
	C. Calcul des amplitudes de relaxation	9
I. 3	Calculs complets pour un mécanisme à trois étapes	15
	A. Calcul des temps de relaxation	15
	B. Calcul des amplitudes de relaxation	23
I. 4	Les techniques de relaxation chimique	31
	A. Perturbation périodique	31
	B. Perturbation transitoire	32
CHAPITRE II. -	CONSTRUCTION ET UTILISATION D'UN APPAREIL DE SAUT DE TEMPERATURE	35
II. 1	Généralités	35
II. 2	Appareillage	39
	A. Dispositif de chauffage	39
	B. Cellule de mesure	43
	C. Porte-cellule	44
	D. Montage optique	45
	E. Unité d'amplification et de contrôle du signal.	53

II. 3. Utilisation de l'appareil de saut de température. 60
A. Mesures par absorption lumineuse 60
B. Mesures par fluorescence 61
C. Modalités d'utilisation 64

II. 4. Mise au point d'un simulateur pour l'exploitation des courbes de relaxation. 68

CHAPITRE III. - ETUDE DE L'INTERACTION DE LA TILORONE AVEC LE DNA 75

III. 1 Matériel et méthodes 77
A. Produits chimiques utilisés 77
B. Appareillage 78
C. Méthodes 78

III. 2 La tilorone et son association avec le DNA et les polynucléotides. 86
A. Caractères de la molécule de tilorone. 86
B. Caractères de la tilorone complexée au DNA et aux polynucléotides. 89

III. 3 Etude stoechiométrique de l'association tilorone-DNA et polynucléotides 93
A. Rappels théoriques concernant la fixation sur une macromolécule 93
B. Principaux résultats 95

III. 4 Etude cinétique de l'association de la tilorone avec le DNA et divers polynucléotides par saut de température 105
A. Conditions expérimentales 105
B. Résultats 107
1) Interaction tilorone-poly[d(A-T)] 107
2) Interaction tilorone-poly(dG)-poly(dC) 111
3) Interaction tilorone-DNA 113
C. Discussion 127
D. Conclusion 132

CHAPITRE IV. - ETUDE CINETIQUE DE L'INTERACTION DE L'HYDROXYSTILBAMIDINE AVEC LE DNA 133

IV. 1 Caractères de l'association de l'OHSA avec le DNA 134
A. Propriétés spectrales 134
B. Principales propriétés de l'association DNA-OHSA 136
C. Modèle proposé par FESTY 138

IV. 2 Etude par polarisation de fluorescence en champ électrique du complexe OHSA-DNA 140
A. Variation des composantes polarisées de fluorescence en champ électrique 141
B. Appareillage 146
C. Méthode et résultats 148
D. Discussion 153

IV. 3 Etude cinétique par saut de température de l'interaction OHSA-DNA 155

Summary - 2 - 157
I. Introduction - 3 - 158
II. Materials - 3 - 158
III. Methods - 4 - 159
IV. Results - 8 - 163
V. Discussion - 23 - 178
1. Fast processes observed in the submillisecond range by means of UV absorption and fluorescence - 23 - 178
2. Slow processes observed in the millisecond range by means of "blue" fluorescence - 28 - 183
Conclusions - 34 - 189
References - 35 - 190

CONCLUSION GENERALE 191

BIBLIOGRAPHIE 195

INTRODUCTION

La régulation du fonctionnement cellulaire est liée en grande partie à l'interaction des acides nucléiques avec les protéines et les petites molécules placées dans leur environnement immédiat. Les études d'interactions de petites molécules avec le DNA contribuent donc à une meilleure connaissance de la structure des acides nucléiques et de leur rôle dans des processus fondamentaux comme la mutagénèse ou la cancérogénèse. Elles présentent également un grand intérêt en pharmacologie, car elles permettent de mieux comprendre le mécanisme d'action des médicaments et des drogues. Mais elles sont rendues extrêmement complexes par le nombre élevé de sites potentiels que comportent les substances impliquées, et les investigations réalisées à l'équilibre chimique permettent rarement d'arriver à une image suffisamment détaillée des phénomènes mis en jeu. C'est la raison pour laquelle depuis quelques années les études à l'équilibre sont souvent complétées par des études cinétiques utilisant les méthodes de relaxation chimique mises au point entre 1955 et 1960 par EIGEN et ses collaborateurs, et qui lui valurent le prix Nobel en 1967. Parmi ces méthodes, la technique du saut de température est particulièrement adaptée à l'étude des interactions entre molécules d'intérêt biologique, tant par sa dépendance à une enthalpie de réaction non nulle que par le domaine de temps de relaxation qu'elle recouvre.

Nous avons mis au point un appareil de saut de température permettant de mesurer des temps de relaxation allant de la micro-

seconde à la seconde ; sa détection optique permet de suivre les variations de concentration des espèces chimiques en solution par mesure de la densité optique, de l'intensité de fluorescence ou de la diffusion de la lumière. Nous décrivons ce travail technologique dans le chapitre II, après avoir exposé dans le chapitre I les principes fondamentaux et les méthodes de calcul de la relaxation chimique dont la connaissance est nécessaire à l'exploitation des résultats cinétiques en termes de mécanismes réactionnels.

Nous avons utilisé cet appareil pour l'étude cinétique des interactions entre le DNA et deux molécules biologiquement actives : la tilorone et l'hydroxystilbamidine (OHSA). Les résultats obtenus pour ces deux colorants font l'objet des chapitres III et IV respectivement.

La tilorone est un colorant qui a la propriété remarquable d'induire la production d'interféron chez la souris. Il était donc intéressant d'approfondir la connaissance du mécanisme de fixation de ce colorant sur le DNA pour pouvoir éventuellement relier les renseignements obtenus à son rôle biologique. Par ailleurs, la tilorone s'apparente à plus d'un titre aux aminoacridines et s'intercale entre les bases des acides nucléiques ; elle peut donc être considérée comme une molécule modèle pour l'élucidation des mécanismes d'interaction du DNA avec les protéines qui contiennent également des résidus aromatiques susceptibles de s'intercaler.

En vue de mieux connaître la stoechiométrie du complexe, l'étude cinétique a été précédée d'un travail à l'équilibre. Au terme de cette étude, nous avons été amenés à proposer deux mécanismes réactionnels rendant compte des résultats expérimentaux.

L'hydroxystilbamidine se différencie de la tilorone par le fait qu'elle ne s'intercale pas dans le DNA. Pourtant, elle possède des propriétés biologiques - un pouvoir mutagène par exemple - généralement considérées comme caractéristiques des colorants qui s'intercalent entre les paires de bases. L'interaction de ce colorant avec les acides nucléiques a été étudiée de manière exhaustive par Festy qui a proposé un modèle de fixation. Dans ce travail, nous avons essayé de vérifier et de préciser ce modèle, d'une part en caractérisant l'orientation de la molécule d'OHSA par rapport à l'axe du polymère par des expériences de polarisation de fluorescence en champ électrique, d'autre part en effectuant une étude cinétique avec les deux possibilités de détection de l'appareil de saut de température.
Cette étude nous a permis de confirmer l'existence de deux sites indépendants de fixation. Elle nous a surtout fait découvrir un phénomène nouveau et inattendu qui est lié à l'état dynamique de la macromolécule, conférant ainsi à l'OHSA un rôle de sonde dans la détection de la "respiration" du DNA.

CHAPITRE I

RELAXATION CHIMIQUE ET MECANISMES REACTIONNELS

I. 1. Le concept de relaxation chimique :

L'étude des cinétiques chimiques rapides se heurte principalement à deux difficultés :

- comment "résoudre" la réaction, c'est-à-dire comment générer un état dynamique plus rapidement que le temps de demi réaction.
- comment suivre l'évolution du système chimique.

Les progrès de l'électronique et la maîtrise des paramètres physicochimiques tels que l'absorption de la lumière, la fluorescence, la conductivité ou l'absorption ultrasonore ou diélectrique ont permis de résoudre élégamment le problème de la détection. Mais les méthodes classiques d'études des cinétiques chimiques qui consistent à mélanger rapidement deux solutions[1] et à suivre la variation de concentration de l'un des réactifs ou produits de la réaction sont limitées par l'impossibilité de réaliser des temps de mélange suffisamment courts. Ainsi la technique de l'écoulement bloqué[2] dans sa version la plus performante ne permet guère de mesurer des temps de demi-réaction inférieurs à la milliseconde.

Pour des systèmes chimiques ayant des temps de demi-réaction de cet ordre de grandeur ou inférieurs, on utilise des techniques dont le principe est très différent et qui font appel au concept de relaxation chimique. Ces techniques sont utilisables lorsqu'on est en présence d'un système chimique à l'équilibre et permettent de mesurer des temps de demi-réaction allant jusqu'à 10^{-10} seconde.

L'état d'équilibre de tout système chimique est fixé par les variables intensives température, pression, champ magnétique ou électrique, etc... La variation rapide de l'un de ces paramètres met le système hors d'équilibre. Le processus par lequel le système tend vers son nouvel état d'équilibre porte le nom de "relaxation chimique". La perturbation étant faible, le système évolue selon une loi exponentielle dont la constante de temps représente le temps de relaxation du système chimique considéré.

Il y a différentes manières de perturber l'équilibre chimique d'un système :

a/ Perturbation transitoire : Si l'on suppose que le paramètre X dont dépend l'équilibre chimique a une valeur constante X_o pour $t < 0$, le système étant à l'équilibre, et que, à l'instant $t = 0$, X prend une nouvelle valeur $X_o + \Delta X$ constante, la perturbation engendre un phénomène transitoire.

b/ Perturbation périodique : Si le paramètre X est une fonction périodique du temps, l'état d'équilibre du système chimique en est une également. Cet état d'équilibre n'est jamais atteint si la période de la perturbation est de l'ordre de grandeur du temps de relaxation du système chimique. La composition chimique du système oscille sans cesse autour d'une

distribution moyenne, et l'énergie absorbée par la réaction est maximale lorsque la période de la perturbation est égale au temps de relaxation.

I. 2. Les équations de la relaxation chimique

A. Définition du temps de relaxation :

Considérons l'exemple simple de l'équilibre d'association-dissociation :

$$A + B \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} C \qquad \text{avec} \quad K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}} \qquad (I,2,1)$$

k_I et k_{-I} sont les constantes de vitesse des réactions d'association et de dissociation respectivement, et K_I est la constante d'équilibre du système.

Appelons C_A, C_B et C_C les concentrations instantanées des espèces A, B et C, et $\overline{C_A}$, $\overline{C_B}$ et $\overline{C_C}$ les valeurs de ces concentrations à l'équilibre, pour la valeur instantanée du paramètre X engendrant la perturbation.
A chaque instant, nous pouvons écrire :

$$C_i = \overline{C_i} + \delta C_i \qquad (I,2,2)$$

La loi de conservation des masses impose la relation :

$$\delta C_A = \delta C_B = - \delta C_C \qquad (I,2,3)$$

La vitesse de réaction s'écrit :

$$v = \frac{dC_A}{dt} = - k_1 C_A C_B + k_{-1} C_C$$

soit

$$\frac{d(\bar{C}_A + \delta C_A)}{dt} = - k_1 (\bar{C}_A + \delta C_A)(\bar{C}_B + \delta C_B) + k_{-1}(\bar{C}_C + \delta C_C) \qquad (I,2,4)$$

Or, à l'équilibre, v = 0, c'est-à-dire :

$$k_1 \bar{C}_A \bar{C}_B = k_{-1} \bar{C}_C \qquad (I,2,5)$$

L'équation I,2,4 se réduit alors à :

$$\frac{d\bar{C}_A}{dt} + \frac{d(\delta C_A)}{dt} = - \{ k_1(\bar{C}_A + \bar{C}_B) + k_{-1} \} \delta C_A - k_1(\delta C_A)^2 \qquad (I,2,6)$$

Dans le cas d'une perturbation de faible amplitude, nous avons $\delta C_A \ll \bar{C}_A$ et le terme δC_A^2 peut être négligé. L'équation différentielle du premier ordre est alors linéaire et, en posant :

$$k_1(\bar{C}_A + \bar{C}_B) + k_{-1} = 1 / \tau \qquad (I,2,7)$$

l'équation I,2,6 conduit à l'équation générale de la relaxation chimique :

$$\boxed{\frac{d(\delta C_A)}{dt} + \frac{\delta C_A}{\tau} + \frac{d\bar{C}_A}{dt} = 0} \qquad (I,2,8)$$

La constante τ est le temps de relaxation du système.

Elle est fonction des constantes de vitesse et des concentrations de l'équilibre final.

- a/ Dans le cas d'une pérturbation transitoire qui est instantanée comparée à τ, nous aurons, pour t > 0 :

$$\frac{d\bar{C}_A}{dt} = 0 \quad , \quad \text{d'où} \quad \frac{d(\delta C_A)}{dt} + \frac{\delta C_A}{\tau} = 0 \qquad (I,2,9)$$

La solution de cette équation différentielle est :

$$\boxed{\delta C_A(t) = \delta C_A^{t=0}\, e^{-t/\tau}} \qquad (I,2,10)$$

- b/ dans le cas d'une perturbation sinusoïdale,

$$\bar{C}_A - C_{A,O} = \delta C_A^{max}\, e^{i\omega t} \qquad (I,2,11)$$

où $C_{A,O}$ *est la valeur de* $\bar{C}_A$ *à l'équilibre avant la perturbation,*

δC_A^{max} *est la variation maximale de* C_A *au cours de la perturbation*

$\omega = 2\pi\nu$, ν *étant la fréquence de la perturbation.*

$i = \sqrt{-1}$

La solution de l'équation I,2,6 est alors donnée par :

$$\boxed{C_A(t) = \frac{i\omega\tau}{1 + i\omega\tau}\, \delta C_A^{max}\, e^{i\omega t}} \qquad (I,2,12)$$

Ce résultat permet de calculer la contribution de la relaxation chimique à l'absorption ultrasonore ou diélectrique.

B. Cas d'un mécanisme réactionnel à plusieurs étapes.

Le comportement réactionnel d'un système chimique ne peut pas toujours s'interpréter par un mécanisme comportant une seule réaction élémentaire, mais plutôt par une suite de plusieurs réactions couplées. Les équations valables dans le cas simple d'une réaction à une seule étape peuvent être généralisées. On obtient alors plusieurs temps de relaxation qui diffèrent de ceux des réactions prises isolément.

Il est évident que le nombre de temps de relaxation dépend du nombre d'étapes indépendantes de la réaction. Comme différents chemins réactionnels peuvent aboutir à un même état, le nombre de temps de relaxation est toujours inférieur ou égal à celui des étapes effectives.

> *Le couplage entre les différentes réactions élémentaires peut être comparé à celui qui existe entre les vibrations d'un système de plusieurs oscillateurs. Les fréquences de résonance d'un tel système correspondent aux modes normaux de vibrations plutôt qu'aux modes de vibration des oscillateurs pris isolément. Par analogie, les temps de relaxation des systèmes de réactions couplées correspondent aux modes normaux de réaction*[7].

Chaque $\frac{dC_i}{dt}$ dépend des concentrations de toutes les autres espèces présentes dans la solution ; dans le cas d'une perturbation transitoire instantanée, - cas auquel nous nous limiterons dorénavant (par exemple un "saut de température")-, on peut facilement obtenir, à partir d'équations analogues à I,2,4 à I,2,6 , une série d'équations différentielles de la forme

$$\frac{d(\delta C_i)}{dt} + \sum_{j=1}^{n} a_{ij}\delta C_j = 0 \qquad (I,2,13)$$

où les a_{ij} sont des coefficients contenant des constantes de vitesse et des concentrations à l'équilibre, et n le nombre de constituants.

En utilisant la notation matricielle, ce système d'équation s'écrit :

$$\frac{d[\delta C]}{dt} = [A]\ [\delta C] \qquad (I,2,14)$$

où $[\delta C]$ est une matrice colonne et $[A]$ une matrice carrée.

Les équations différentielles I,2,13 ne sont pas toutes indépendantes. Leur nombre peut être réduit en appliquant la loi de conservation des masses. Les temps de relaxation qui correspondent aux réactions normales vérifient l'équation :

$$\frac{dy_i}{dt} = -\frac{1}{\tau_i}\, y_i \qquad (I,2,15)$$

où les y_i sont les concentrations normales obtenues par une transformation linéaire des δC_i (éq. I,2,16)

$$y_i = \sum_{k=1}^{n} m_{i,k}\, \delta C_k \qquad (I,2,16)$$

ou, sous forme matricielle :

$$\begin{cases} [Y] = [M]\ [\delta C] \\ [\delta C] = [M]^{-1}\ [Y] \end{cases} \qquad (I,2,17)$$

Les relations I,2,14 et I,2,17 nous permettent d'écrire :

$$\frac{d\,[Y]}{dt} = [B]\,[Y]$$

avec $[B] = [M]\,[A]\,[M]^{-1}$

La matrice [B] qui est en accord avec I,2,15 est diagonale. La diagonale de [B] , dont les éléments b_{ii} sont les $1/\tau_i$, est alors formée des valeurs propres λ_i de l'équation caractéristique, et les y_i sont les vecteurs propres du système :

$$-\frac{dy_i}{dt} = \sum_j a_{ij}\, y_j = \lambda_i\, y_i$$

c'est-à-dire $([A] - \lambda)\,[Y] = 0$, donc $[A] - \lambda = 0$

Cette équation caractéristique s'écrit sous forme de déterminant :

$$\begin{vmatrix} a_{11}-\lambda & a_{12} & \cdots & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22}-\lambda & & \vdots \\ \vdots & & \ddots & \vdots \\ a_{n1} & \cdots & \cdots & a_{nn}-\lambda \end{vmatrix} = 0 \qquad \text{(I,2,18)}$$

On obtient donc une équation de degré n dont les n racines sont les temps de relaxation du système. On peut montrer[7] qu'il existe une transformation linéaire qui rend la matrice [A] symétrique ; les $1/\tau_i$ sont donc tous réels et positifs ou nuls, et les solutions des équations différentielles I,2,15 sont toutes des fonctions ex-

ponentielles réelles décroissantes. En utilisant la relation I,2,17 , la solution du système d'équations différentielles linéaires I,2,13 s'écrit alors :

$$\delta c_i(t) = \sum_{j=1}^{n} A_{ij} e^{-t/\tau_j} \qquad \text{(I,2,19)}$$

avec $A_{ij} = m'_{ij} y_j$, les m'_{ij} étant les éléments de la matrice $[M]^{-1}$.

En pratique, les temps de relaxation observés sont souvent dans un rapport voisin ou supérieur à 10. Le couplage entre les diverses réactions normales est assez lâche, et on peut simplifier le calcul par diverses approximations (voir l'exemple du paragraphe I,3).

C. Calcul des amplitudes de relaxation.

La considération des amplitudes est importante dans toute étude cinétique faisant appel au concept de relaxation chimique. Elle permet souvent de déterminer les grandeurs thermodynamiques extensives reliées à la grandeur intensive qui donne naissance à la perturbation de l'équilibre (par exemple ΔH s'il s'agit d'un "saut de température"). Le calcul des amplitudes permet également de savoir si tel ou tel temps de relaxation est observable et donne de ce fait de précieuses indications pour le choix d'un mécanisme réactionnel s'il y a plusieurs possibilités.
Dans leur développement des équations générales de la relaxation chimique, EIGEN et DE MAEYER[7] ont fait une analyse des amplitu-

des de relaxation en terme de "réactions normales". Cette analyse est malheureusement difficilement utilisable dans la pratique. THUSIUS[8], en partant de ces équations pour deux réactions couplées, a développé des relations permettant, par simple inspection de la stoechiométrie, de lier la variation totale du signal aux paramètres thermodynamiques associés aux étapes élémentaires.

a) Considérons d'abord une réaction simple à une étape

$$\sum_i \nu_i B_i = 0 \qquad \text{(I,2,20)}$$

ν_i *étant le coefficient stoechiométrique de l'espèce* B_i :

- $\nu_i < 0$ *pour les réactifs.*
- $\nu_i > 0$ *pour les produits.*

Si P est une propriété physique proportionnelle à la concentration de chacune des espèces chimiques en solution, la relation I,2,10 permet d'écrire :

$$\delta P(t) = \delta P_o e^{-t/\tau}$$

δP_o *étant l'amplitude de la relaxation.*

Soit ϕ_i le coefficient spécifique de l'espèce chimique B_i correspondant à la propriété P, et $\delta \bar{C}_i$ la variation de la concentration $\bar{C}_i$ de l'espèce B_i entre l'équilibre initial et l'équilibre final :

$$\phi_i = \partial P / \partial \bar{C}_i \qquad \text{(I,2,21)}$$

(ϕ_i *sera par exemple un coefficient d'extinction, une conductivité spécifique , etc...*)

Posons $\Delta\Phi = \sum \nu_i \phi_i$ (I,2,22)

La relation I,2,21 s'écrit alors :

$$\delta P_o = \Delta\Phi \; \Gamma \; \frac{\delta \overline{C_i}}{\nu_i} \qquad \text{(I,2,23)}$$

EIGEN et DE MAEYER[7] ont montré que $\delta\overline{C}_i$ s'exprime de façon simple en fonction des concentrations à l'équilibre et de la variation de la constante d'équilibre K :

$$\delta\overline{C_i} = \nu_i \Gamma \; \delta \ln K \qquad \text{(I,2,24)}$$

où $$\Gamma = \frac{1}{\sum \nu_i^2 / \overline{C_i}} \qquad \text{(I,2,25)}$$

Γ est appelé le facteur d'amplitude.

Les relations I,2,23 et I,2,24 conduisent à

$$\delta P_o = \Delta\Phi \; \Gamma \; \delta \ln K \qquad \text{(I,2,26)}$$

Dans le cas d'un saut de température, la variation de K en fonction de la température est régie par la loi de Van't Hoff

$$\frac{\delta \ln K}{\delta T} = \frac{\Delta H}{RT^2} \qquad \text{(I,2,27)}$$

où ΔH *est la variation d'enthalpie de la réaction,*
T *la température absolue et* R *la constante des gaz parfaits.*

La relation I,2,27 s'écrit alors :

$$\delta P_o = \Delta\Phi \; \Gamma \; \Delta H \frac{\delta T}{RT^2} \qquad \text{(I,2,28)}$$

Cette équation donne directement δP_o en fonction de Γ qui peut être calculé si on connait K. La pente de la droite permet alors d'accéder à ΔH.

b) Cas d'une suite de deux étapes couplées :

A chacune des deux étapes I et II, nous associerons sa constante d'équilibre qui est de la forme

$$K_M = \prod_i C_{i,M}^{\nu_{i,M}} \qquad \text{(avec M = I ou II)}$$

Or d'après la loi de conservation de la masse, il existe plusieurs relations entre les différents $\delta\bar{C}_i/\nu_i$ qui permettent, dans la relation I,2,20, de réduire leur nombre au nombre d'étapes indépendantes (2 dans notre cas, $\delta\bar{C}_{A_i}/\nu_{A_i}$ et $\delta\bar{C}_{B_i}/\nu_{B_i}$, A_i n'apparaissant que dans l'étape I et B_i dans l'étape II.) THUSIUS[8] montre alors que ces deux $\frac{\delta\bar{C}_i}{\nu_i}$ convenablement choisis sont reliés à $\delta\ln K_I$ et $\delta\ln K_{II}$ par une relation où n'interviennent que Γ_I, Γ_{II} et un facteur de couplage f de la forme $\sum \frac{\nu_j^I \nu_j^{II}}{\bar{C}_j}$, les $\bar{C}_j$ étant des concentrations d'espèces apparaissant à la fois dans la réaction I et dans la réaction II :

$$\begin{cases} \dfrac{\delta\bar{C}_A}{\nu_A} = \dfrac{\Gamma_I}{1 - \Gamma_I\Gamma_{II}f^2} \left[\delta\ln K_I - \Gamma_{II}f\ \delta\ln K_{II} \right] \\ \\ \dfrac{\delta\bar{C}_B}{\nu_B} = \dfrac{\Gamma_{II}}{1 - \Gamma_I\Gamma_{II}f^2} \left[\delta\ln K_{II} - \Gamma_I f\ \delta\ln K_I \right] \end{cases} \qquad \text{(I,2,30)}$$

$\Gamma_I f$ et $\Gamma_{II} f$ sont appelés "constantes de couplage".

Etant donné que les concentrations indépendantes C_A et C_B ne sont pas des "concentrations normales", l'amplitude qui peut être associée à chacune d'elles ne représente pas l'amplitude d'un temps de relaxation. Par contre, l'équation I,2,23 se généralise pour obtenir l'amplitude totale, sous la forme suivante :

$$\delta P_o^{tot} = \Delta\Phi_I \frac{\delta\bar{C}_A}{\nu_A} + \Delta\Phi_{II} \frac{\delta\bar{C}_B}{\nu_B} \qquad \text{(I,2,31)}$$

$\Delta\Phi_I$ *et* $\Delta\Phi_{II}$ *étant respectivement les* $\Delta\Phi$ *associés aux étapes I et II.*

L'examen des relations I,2,30 et I,2,31 montre que :

$$\delta P_o^{tot} = X_I \delta\ln K_I + X_{II} \delta\ln K_{II} \qquad \text{(I,2,32)}$$

$$\text{avec} \begin{cases} X_I = \dfrac{\Gamma_I}{1-\Gamma_I\Gamma_{II}f^2}\,(\Delta\Phi_I - \Gamma_{II}f\Delta\Phi_{II}) \\ X_{II} = \dfrac{\Gamma_{II}}{1-\Gamma_I\Gamma_{II}f^2}\,(\Delta\Phi_{II} - \Gamma_I f\Delta\Phi_I) \end{cases}$$

Dans le cas d'un couplage assez lâche entre les deux temps de relaxation (par exemple s'ils sont dans un rapport supérieur à 10, les amplitudes associées à ces deux temps s'obtiennent aisément en considérant que l'étape rapide n'est pas perturbée par l'étape lente, d'où δP_o^1 ; après le calcul de δP_o^{tot}, on obtient δP_o^2 par différence (voir détails au paragraphe I,3) :

$$\delta P_o^2 = \delta P_o^{tot} - \delta P_o^1 \qquad (I,2,33)$$

I. 3. Calculs complets pour un mécanisme à trois étapes.

Ces calculs sont effectués dans un cas précis : celui du mécanisme réactionnel I,3,1. Un tel mécanisme se rencontre très souvent dans le cas d'interactions dans les systèmes biologiques.

$$A + B \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} C \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} D \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} E \qquad (I,3,1)$$

L'examen de la stoechiométrie et des relations entre les concentrations des différentes espèces permettent immédiatement de conclure qu'il y a 3 étapes indépendantes, donc 3 temps de relaxation associés à ce mécanisme.

Les constantes d'équilibre s'écrivent :

$$K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{\bar{C}_C}{\bar{C}_A\,\bar{C}_B} \quad ; \quad K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}} = \frac{\bar{C}_D}{\bar{C}_C} \quad ; \quad K_3 = \frac{k_3}{k_{-3}} = \frac{\bar{C}_E}{\bar{C}_D} \qquad (I,3,2)$$

et la constante d'association apparente s'écrit :

$$K_{app} = \frac{\bar{C}_C + \bar{C}_D + \bar{C}_E}{\bar{C}_A\,\bar{C}_B} = K_1\{1 + K_2(1 + K_3)\} \qquad (I,3,3)$$

A. Calcul des temps de relaxation :

a) Considérons d'abord chaque étape isolément. Le temps de relaxation qui lui est associé est effectivement celui que l'on observe si cette étape est beaucoup plus rapide que celles qui lui sont adjacentes ou directement liées ; en effet, la variation du signal due aux étapes lentes est encore négligeable lorsque lorsque la relaxation de l'étape rapide est presque

terminée.

- Pour l'étape $A + B \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} C$, nous avons vu que (paragr.I,2,A):

$$\boxed{1/\tau_1 = k_1(\bar{C}_A + \bar{C}_B) + k_{-1}}$$

- Pour l'étape $C \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} D$, nous avons :

$$\frac{dC_C}{dt} = -k_2 C_C + k_{-2} C_D$$

et $$\delta C_C = -\delta C_D$$

L'équation I,2,8 s'écrit alors :

$$\frac{d(\delta C_C)}{dt} = -(k_2 + k_{-2})\,\delta C_C$$

d'où $$\boxed{1/\tau_2 = k_2 + k_{-2}} \qquad (I,3,4)$$

- pour l'étape $D \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} E$, nous avons de même :

$$1/\tau_3 = k_3 + k_{-3}$$

b) *Cas général* : Les temps de relaxation sont les valeurs propres de la matrice suivante :

$$\begin{bmatrix} k_1(\bar{C}_A + \bar{C}_B) + k_{-1} & -k_{-1} & 0 \\ -k_2 & k_2 + k_{-2} & -k_{-2} \\ 0 & -k_3 & k_3 + k_{-3} \end{bmatrix} \qquad (I,3,5)$$

L'équation caractéristique associée à cette matrice est une équation du troisième degré délicate à résoudre. Nous distinguerons plusieurs cas :

α) LES TEMPS DE RELAXATION SONT VOISINS :

$$0,1 < \frac{\tau_i}{\tau_{i+1}} < 10$$

HAMMES et HASLAM[9] ont alors utilisé les théorèmes généraux qui disent que la somme des valeurs propres est égale à la trace de la matrice, la somme des produits de toutes les paires de valeurs propres est égale aux produits de toutes les paires d'éléments de la diagonale moins les produits de toutes les paires d'éléments hors de la diagonale du type $a_{ij}a_{ji}(j\neq i)$, et le produit des trois valeurs propres est égal au déterminant de la matrice :

$$\left.\begin{aligned} 1/\tau_1+1/\tau_2+1/\tau_3 &= k_1(\bar{C}_A+\bar{C}_B) + k_{-1} + k_2 + k_3 + k_{-3} \\ 1/\tau_1\tau_2+1/\tau_2\tau_3+1/\tau_1\tau_3 &= k_1(\bar{C}_A+\bar{C}_B)(k_2 + k_{-2} + k_3 + k_{-3}) \\ &\quad + k_{-1}k_{-2} + k_{-2}k_{-3} + (k_{-1} + k_2)(k_3 + k_{-3}) \\ 1/\tau_1\tau_2\tau_3 &= k_1(\bar{C}_A+\bar{C}_B)(k_2k_3 + k_2k_{-3} + k_{-2}k_{-3}) + k_{-1}k_{-2}k_{-3} \end{aligned}\right\} (I,3,6)$$

Les termes de gauche des équations I,3,6 sont des quantités obtenues par l'expérience. Ils sont toujours des fonctions linéaires de $\bar{C}_A + \bar{C}_B$. Les trois pentes et les trois ordonnées à l'origine des droites obtenues donnent six équations qui permettent en principe de déterminer les six constantes de vitesse.

Envisageons maintenant les cas dans lesquels les temps de relaxation sont dans un rapport supérieur à 10. Le calcul se simplifie alors considérablement.

β) L'ETAPE 1 EST LENTE, L'ETAPE 2 EST RAPIDE ET L'ETAPE 3 EST TRES LENTE.

- D'après la remarque du paragraphe I,3,A,a, le temps de relaxation le plus rapide est effectivement associé à l'étape 2 et sa valeur est :

$$1/\tau_2 = k_2 + k_{-2}$$

- Pour déterminer $1/\tau_1$, on peut négliger la troisième étape, beaucoup plus lente ; $1/\tau_1$ est alors une solution de l'équation caractéristique suivante :

$$\begin{vmatrix} k_1(\bar{C}_A + \bar{C}_B) + k_{-1} - 1/\tau & k_{-1} \\ k_2 & k_2 + k_{-2} - 1/\tau \end{vmatrix} = 0 \qquad (I,3,7)$$

Comme $1/\tau_1 << 1/\tau_2$, on peut négliger $1/\tau_1$ devant $k_2 + k_{-2}$.

Il reste :

$$\begin{vmatrix} k_1(\bar{C}_A + \bar{C}_B) + k_{-1} - 1/\tau_1 & k_{-1} \\ k_2 & k_2 + k_{-2} \end{vmatrix} = 0 \qquad (I,3,8)$$

d'où $$\boxed{1/\tau_1 = k_1 (\bar{C}_A + \bar{C}_B) + \frac{k_{-1}}{1+K_2}} \qquad (I,3,9)$$

Par analogie avec la relation I,2,7, nous écrirons :

$$1/\tau_1 = k_1 (\bar{C}_A + \bar{C}_B) + k^*_{-1}$$

avec $$k^*_{-1} = \frac{k_{-1}}{1+K_2}$$

et nous définirons formellement une nouvelle constante d'équilibre K_1, associée à τ_1 : $K^*_1 = \frac{k_1}{k^*_{-1}} = K_1 (1 + K_2)$

- Pour déterminer $1/\tau_3$, l'équation caractéristique associée à la matrice I,3,5 s'écrit :

$$\begin{vmatrix} k_1(\bar{C}_A + \bar{C}_B) + k_{-1} & - k_{-1} & 0 \\ - k_2 & k_2 + k_{-2} & - k_{-2} \\ 0 & - k_3 & k_3 + k_{-3} - 1/\tau_3 \end{vmatrix} = 0 \qquad (I,3,10)$$

parce que $1/\tau_3 \ll k_2 + k_{-2}$

et $1/\tau_3 \ll k_1(\bar{C}_A + \bar{C}_B) + k_{-1}$

On obtient :

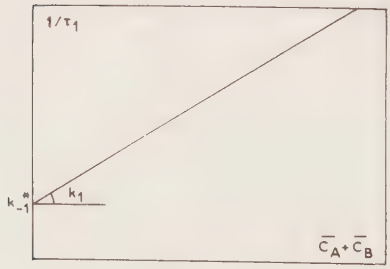
$$\boxed{1/\tau_3 = k_{-3} + k^*_3 \frac{\bar{C}_A + \bar{C}_B}{1/K^*_1 + \bar{C}_A + \bar{C}_B}} \qquad (I,3,11)$$

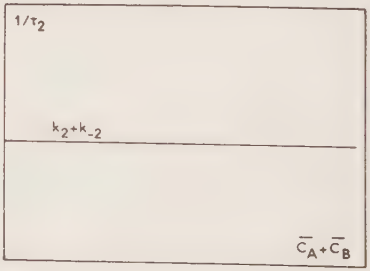
avec $$k_3^* = k_3 \frac{K_2}{1 + K_2}$$

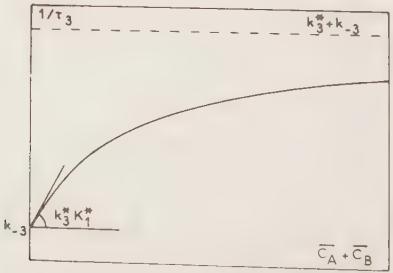
De même que pour τ_1, nous définirons une constante d'équilibre K_3^* associée à τ_3 :

$$K_3^* = \frac{k_3^*}{k_{-3}} = K_3 \frac{K_2}{1 + K_2} = \frac{K_3}{1 + K_2^{-1}}$$

La représentation de $1/\tau_1$ en fonction de $\bar{C}_A + \bar{C}_B$ est une droite de pente k_1 et d'ordonnée à l'origine k_{-1}^*.
La représentation de $1/\tau_2$ en fonction de $\bar{C}_A + \bar{C}_B$ est une droite horizontale d'ordonnée $k_2 + k_{-2}$.
La représentation de $1/\tau_3$ en fonction de $\bar{C}_A + \bar{C}_B$ est une portion d'hyperbole d'asymptote $k_3^* + k_{-3}$, d'ordonnée à l'origine k_{-3} et de pente à l'origine $k_3 K_1 K_2 = k_3^* K_1^*$.







Il y a donc indétermination sur k_{-1} , k_3 , k_2 et k_{-2} si l'on n'arrive pas à mesurer la constante K_2 au moyen d'une autre technique expérimentale, car on ne peut atteindre que k^*_{-1} , k^*_3 et $k_2 + k_{-2}$. k_{-1} et k_3 sont les constantes de vitesse associées aux demi-réactions qui partent des composants d'une étape rapide du premier ordre.

Cette indétermination est un cas général : chaque fois qu'une telle situation se présente, les facteurs $\frac{1}{1 + K_2}$ et $\frac{1}{1 + 1/K_2}$ sont multipliés à k_{-1} et k_3 respectivement.

Tout se passe comme si nous avions la réaction suivante :

$$A + B \underset{k^*_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} (C + D) \underset{k_{-3}}{\overset{k^*_3}{\rightleftharpoons}} E \qquad (I,3,12)$$

où (C + D) représenterait une seule et même espèce chimique à la concentration $C_C + C_D$. Il est en effet facile d'imaginer que, l'espèce C étant en équilibre rapide avec l'espèce D, les étapes lentes voisines ne distinguent pas ces deux constituants entre eux et les confondent. Cette remarque donne une justification théorique à la méthode de substitution employée par CZERLINSKI[10].

γ) L'ETAPE 1 EST LENTE, L'ETAPE 2 EST TRES LENTE ET L'ETAPE 3 EST RAPIDE.

Un calcul similaire à celui du précédent paragraphe ou la méthode de substitution conduit aux expressions suivantes des temps de relaxation :

$$1/\tau_3 = k_3 + k_{-3}$$

$$1/\tau_1 = k_1(\bar{C}_A + \bar{C}_B) + k_{-1}$$

$$1/\tau_2 = k^*_{-2} + k_2 \frac{(\bar{C}_A + \bar{C}_B)}{1/K_1 + \bar{C}_A + \bar{C}_B} \qquad (I,3,13)$$

avec $k^*_{-2} = \dfrac{k_{-2}}{1 + K_3}$

Nous voyons que le simple examen de la variation des trois temps de relaxation avec $\bar{C}_A + \bar{C}_B$ ne permet pas de choisir entre le cas β) et le cas γ) , les seules différences portant sur l'expression des constantes.

δ) L'ETAPE 1 EST RAPIDE, L'ETAPE 2 EST LENTE ET L'ETAPE 3 EST TRES LENTE.

Nous aurons :

$$\left\{ \begin{array}{l} 1/\tau_1 = k_1(\bar{C}_A + \bar{C}_B) + k_{-1} \\ 1/\tau_2 = k_{-2} + k_2 \dfrac{\bar{C}_A + \bar{C}_B}{1/K_1 + \bar{C}_A + \bar{C}_B} \\ 1/\tau_3 = k_{-3} + k^*_3 \dfrac{\bar{C}_A + \bar{C}_B}{1/K^*_2 + \bar{C}_A + \bar{C}_B} \end{array} \right. \qquad (I,3,14)$$

avec $k^*_3 = k_3 \dfrac{K_2}{1 + K_2}$ et $K^*_2 = K_1(1 + K_2)$

Ici $1/\tau_2$ et $1/\tau_3$ sont tous les deux des fonctions hyperboliques de $\bar{C}_A + \bar{C}_B$. Ce mécanisme se distinguera donc facilement des deux précédents.

ε) L'ETAPE 1 EST LENTE COMPAREE AUX DEUX AUTRES.

Prenons l'étape 3 comme étant la plus rapide :

$$1/\tau_3 = k_3 + k_{-3}$$

$$1/\tau_2 = k_2 + k^{*}_{-2}$$

avec $k^{*}_{-2} = \dfrac{k_{-2}}{1 + K_3}$ et $K^{*}_2 = K_2(1 + K_3)$ (I,3,15)

$$1/\tau_1 = k_1(\bar{C}_A + \bar{C}_B) + k^{*}_{-1}$$

avec $k^{*}_{-1} = \dfrac{k_{-1}}{1 + K^{*}_2}$

Dans ce cas, $1/\tau_1$ varie linéairement avec $\bar{C}_A + \bar{C}_B$, tandis que $1/\tau_2$ et $1/\tau_3$ sont indépendants de cette quantité.

B. Calcul des amplitudes de relaxation :

Supposons, pour simplifier, que les temps de relaxation soient suffisamment différents pour que nous puissions examiner les étapes réactionnelles successivement, – la plus rapide d'abord, la plus lente à la fin –, comme nous l'avons fait pour le calcul des temps de relaxation (remarque du paragraphe I,3,A,a).

a) Calculons, pour commencer, l'amplitude de relaxation pour chaque étape prise isolément, ce qui nous donnera l'amplitude de cette étape dans le cas où elle est la plus rapide du mécanisme.
Dans la relation I,2,27, il suffit de remplacer Γ par sa valeur :

$$\Gamma_1 = \frac{\bar{C}_C}{1 + K_1(\bar{C}_A + \bar{C}_B)} \quad ; \quad \Gamma_2 = \frac{\bar{C}_D}{1 + K_2} \quad ; \quad \Gamma_3 = \frac{\bar{C}_E}{1 + K_3} \qquad (I,3,16)$$

b) L'ETAPE 1 EST LENTE, L'ETAPE 2 EST RAPIDE ET L'ETAPE 3 EST TRES LENTE .

- Nous avons : $A_2 = \Delta\Phi_2 \, \Gamma_2 \, \delta \ln K_2$ (I,3,17)

Dans le cas d'une expérience de saut de température avec détection par spectroscopie d'absorption:

$$A_2 = \Delta\Phi_2 \, \Gamma_2 \, \frac{\Delta H_2}{RT^2} \, \delta T$$

avec $\Delta\Phi_2 = (\varepsilon_D - \varepsilon_C) \, \ell$

ε_C *et* ε_D *étant respectivement les coefficients d'extinction molaire des espèces C et D, et* ℓ *le parcours optique.*

- L'étape la plus lente peut être négligée lors du calcul de

Le système envisagé s'écrit donc:

$$A + B \rightleftharpoons C \rightleftharpoons D$$

et les constantes d'équilibre qui lui sont associées sont:

$$K_1 = \frac{\bar{C}_C}{\bar{C}_A \cdot \bar{C}_B} \quad \text{et} \quad K_2 = \frac{\bar{C}_D}{\bar{C}_C} \qquad \text{(I,3,18)}$$

La relation I,2,28 donne alors :

$$\left\{ \begin{array}{l} \delta \ln K_1 = \dfrac{\delta \bar{C}_C}{\bar{C}_C} - \dfrac{\delta \bar{C}_A}{\bar{C}_A} - \dfrac{\delta \bar{C}_B}{\bar{C}_B} \\ \delta \ln K_2 = \dfrac{\delta \bar{C}_D}{\bar{C}_D} - \dfrac{\delta \bar{C}_C}{\bar{C}_C} \end{array} \right. \qquad \text{(I,3,19)}$$

Or : $\delta \bar{C}_A = \delta \bar{C}_B$ et $\delta \bar{C}_C = -\delta \bar{C}_D - \delta \bar{C}_A$ (I,3,20)

La combinaison des équations I,3,18 et I,3,20 conduit à la relation matricielle :

$$-\begin{bmatrix} \delta \ln K_1 \\ \delta \ln K_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \Gamma_1^{-1} & 1/\bar{C}_C \\ -1/\bar{C}_C & -\Gamma_2^{-1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \delta \bar{C}_A \\ \delta \bar{C}_D \end{bmatrix}$$

$$\begin{cases} \delta \bar{C}_A = -\dfrac{\Gamma_1}{1 - \Gamma_1 \Gamma_2 f^2} \left(\delta \ln K_1 - \Gamma_2 f \, \delta \ln K_2 \right) \\ \delta \bar{C}_D = \dfrac{\Gamma_2}{1 - \Gamma_1 \Gamma_2 f^2} \left(\delta \ln K_2 - \Gamma_1 f \, \delta \ln K_1 \right) \end{cases} \qquad \text{(I,3,21)}$$

avec $f = -1/\bar{C}_C$

Ces équations sont semblables aux relations I,2,29 données plus haut. L'amplitude totale $A_1 + A_2$ est alors :

$$A_1 + A_2 = -\Delta\Phi_1 \, \delta \bar{C}_A + \Delta\Phi_2 \, \delta \bar{C}_D \qquad \text{(I,3,22)}$$

On obtient l'amplitude A_1 associée au temps de relaxation τ_1 en combinant les relations I,3,17 et I,3,22 :

$$A_1 = (A_1 + A_2) - A_2 = -\Delta\Phi_1 \delta C_A + \Delta\Phi_2 \delta C_D - \Delta\Phi_2 \Gamma_2 \delta \ln K_2 \qquad \text{(I,3,23)}$$

soit, en remplaçant $\delta \bar{C}_A$ et $\delta \bar{C}_D$ par leurs valeurs (équations I,3,21)

$$\boxed{A_1 = (\Delta\Phi_1 - \Gamma_2 f \, \Delta\Phi_2) \left(\frac{\Gamma_1}{1 - \Gamma_1 \Gamma_2 f^2} \right) (\delta \ln K_1 - \Gamma_2 f \, \delta \ln K_2)}$$

(I,3,24)

avec, dans le cas d'une détection par spectroscopie d'absorption :

$$\Delta\Phi_1 = (\varepsilon_C - \varepsilon_B - \varepsilon_A)\,\ell$$

$$\Delta\Phi_2 = (\varepsilon_D - \varepsilon_C)\,\ell$$

- Dans le calcul de A_3, nous pouvons mettre à profit la remarqu exposée plus haut (page 21) qui nous a conduit à remplacer le mécanisme réactionnel considéré par le schéma I,3,12 . En effet:

$$K_1(1 + K_2) = K_1^* = \frac{(\bar{C}_C + \bar{C}_D)}{\bar{C}_A \cdot \bar{C}_B} \qquad (I,3,25)$$

et $$K_3 \frac{1}{1 + K_2^{-1}} = K_3^* = \frac{\bar{C}_E}{(\bar{C}_C + \bar{C}_D)} \qquad (I,3,26)$$

Nous pouvons ainsi calculer $A^*_{tot} = A_1^* + A_3^*$ par le même raisonneme que celui qui a permis d'obtenir $(A_1 + A_2)$. Notons que A^*_{tot} n'es pas égal à l'amplitude totale A_{tot} ; en effet, les constituants C et D étant considérés comme une seule et même espèce dans le schéma I,3,12 , le calcul des amplitudes A_1^* et A_3^* se fait sur un mécanisme réactionnel dans lequel la relaxation rapide est déjà terminée. Donc :

$$A^*_{tot} = A_{tot} - A_2$$

De plus, $A_1^* \equiv A_1$ et $A_3^* \equiv A_3$

A_1 étant connu (équation I,3,24) et A^*_{tot} pouvant être calculé, nous pouvons obtenir A_3 par différence.

Néanmoins, vérifions d'abord la relation $A_1^* \equiv A_1$ en calculant A_1^* pour la "partie rapide" du schéma réactionnel I,3,12 :

$$A + B \rightleftharpoons (C + D)$$

L'amplitude associée à ce schéma est :

$$A_1^* = \Delta\Phi_1^* \, \Gamma_1^* \, \delta \ln K_1^* \qquad (I,3,27)$$

avec
$$\begin{cases} K_1^* = K_1 (1 + K_2) \\ \Gamma_1^* = \dfrac{1}{\dfrac{1}{\bar{C}_A} + \dfrac{1}{\bar{C}_B} + \dfrac{1}{\bar{C}_C + \bar{C}_D}} \end{cases}$$

$\Delta\Phi_1^* = (\varepsilon_{(C+D)} - \varepsilon_B - \varepsilon_A)\,\ell$ *dans le cas de la spectroscopie d'absorption comme moyen de détection.*

En posant $\varepsilon_{(C+D)} = \dfrac{\varepsilon_C \bar{C}_C + \varepsilon_D \bar{C}_D}{\bar{C}_C + \bar{C}_D}$, relation qui traduit le fait que le coefficient moyen $\varepsilon_{(C+D)}$ de $(\bar{C}_C + \bar{C}_D)$ est formé par les contributions respectives des espèces C et D à l'absorption, et en remplaçant $\bar{C}_D$ par $\bar{C}_D = K_3 \bar{C}_C$, on identifie facilement les relations I,3,24 et I,3,27 .

L'expression de A_{tot}^* s'obtient au moyen des relations I,2,29 qui s'écrivent :

$$\begin{cases} \delta\bar{C}_A = -\dfrac{\Gamma_1^*}{1 - \Gamma_1^* \Gamma_3^* f^2} \left(\delta \ln K_1^* - \Gamma_3^* \, f \, \delta \ln K_3^* \right) \\ \delta\bar{C}_E = \dfrac{\Gamma_3^*}{1 - \Gamma_1^* \Gamma_3^* f^2} \left(\delta \ln K_3^* - \Gamma_1^* \, f \, \delta \ln K_1^* \right) \end{cases}$$

avec $f = 1/(\bar{C}_C + \bar{C}_D)$, $\Gamma_3^* = \dfrac{1}{\dfrac{1}{\bar{C}_E} + \dfrac{1}{\bar{C}_C + \bar{C}_D}}$

et Γ_1^* , K_1^* et K_3^* comme définis plus haut.

Par conséquent :

$$A_3 = A^*_{tot} - A_1 = - \Delta\Phi^*_1 \delta\bar{C}_A + \Delta\Phi^*_3 \delta\bar{C}_E - \Delta\Phi^*_1 \Gamma^*_1 \delta \ln K^*_1$$

D'où :

$$A_3 = (\Delta\Phi^*_3 - \Delta\Phi^*_1 \Gamma^*_1 f) \left(\frac{\Gamma^*_3}{1 - \Gamma^*_1 \Gamma^*_3 f^2} \right) (\delta \ln K^*_3 - \Gamma^*_1 f \delta \ln K^*_1) \qquad (I,3,28)$$

avec $\Delta\Phi^*_3 = (\varepsilon_E - \varepsilon_{(C+D)})\ell$ *dans le cas de la spectroscopie d'absorption, et les définitions précédentes.*

Notons enfin que :

$$\begin{cases} \delta \ln K^*_1 = \delta \ln K_1 + \dfrac{K_2}{1 + K_2} \delta \ln K_2 \\ \delta \ln K^*_3 = \delta \ln K_3 + \dfrac{1}{1 + K_2} \delta \ln K_2 \end{cases}$$

Dans le cas d'un saut de température, nous pouvons déduire de ces relations que :

$$\begin{cases} \Delta H^*_1 = \Delta H_1 + \dfrac{K_2}{1 + K_2} \Delta H_2 \\ \Delta H^*_3 = \Delta H_3 + \dfrac{1}{1 + K_2} \Delta H_2 \end{cases}$$

La même indétermination existe au niveau des grandeurs thermodynamiques qu'à celui des temps de relaxation si nous ne pouvons connaître la valeur de K_2 au moyen d'une autre technique expérimentale.

Nous ne traiterons pas les différents autres cas envisagés lors du calcul des temps de relaxation pour le mécanisme à trois étapes considéré (1,3,1) ; en effet, le calcul et les résultats se présentent toujours de la même manière et il suffira de se référer à l'exemple précédent en prenant les facteurs d'amplitude et les indices convenables pour tous les cas possibles.

Remarque concernant l'exploitation des amplitudes de relaxation dans le cas des techniques utilisant la spectroscopie d'absorption ou de fluorescence .

Ces diverses considérations sur les amplitudes de relaxation semblent indiquer qu'il est relativement aisé d'exploiter les amplitudes et d'en déduire certaines grandeurs thermodynamiques; il faut néanmoins s'entourer d'un certain nombre de précautions, car les $\Delta\Phi_i$ sont mal connus; en effet, pour avoir un rapport signal sur bruit élevé, il faut généralement ouvrir les fentes du monochromateur et il en résulte une distribution de l'intensité lumineuse autour d'une longueur d'onde moyenne. Cette lumière va être absorbée par un composé ayant un spectre de forme donnée dans cette "fenêtre" de longueurs d'onde. De plus, si l'on utilise une lampe à vapeur de mercure, la forme du pic d'émission de la lampe interviendra.

Les études des chapitres III et IV ont été effectuées avec l'appareil de saut de température dont il va être question plus loin sans tenir compte de l'éventualité d'une exploitation quantitative ultérieure des amplitudes de relaxation; les fentes du monochromateur étaient relativement ouvertes pour avoir un bon signal, étant donné sa complexité et/ou l'ordre de grandeur de son ampli-

tude. Nous avons mesuré les amplitudes de relaxation d'une solution donnée (tilorone - DNA) pour diverses ouvertures des fentes du monochromateur; les variations sont énormes, ce qui est normal, vu l'étroitesse du pic d'absorption de la tilorone. Les résultats des calculs précédents n'ont donc été utilisés que de façon qualitative.

I. 4. Les techniques de relaxation chimique.

Ce paragraphe est consacré à une brève description des différentes techniques effectivement utilisées dans les laboratoires de cinétique, le principe des deux catégories de relaxation ayant été exposé au paragraphe I,1.

A. Techniques utilisant une perturbation périodique :

Nous en citerons essentiellement deux :

a) L'absorption ultrasonore: la perturbation est une variation sinusoïdale de la pression et de la température en fonction du temps. On détermine le coefficient d'absorption soit par une méthode interférométrique à deux transducteurs[11], soit par une méthode impulsionnelle[12]. Pour qu'il y ait absorption ultrasonore dans les solutions aqueuses, la variation de volume entre réactifs et produits ne doit pas être nulle. En effet :

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial P}\right)_T = -\frac{1}{RT}\left(\Delta V_o + \frac{\alpha_P}{\rho c_P}\Delta H_o\right) \qquad (I,4,1)$$

où α_P *est le coefficient d'expansion thermique,*
ρ *est la densité*
et c_P *est la chaleur spécifique.*
Le terme contenant ΔH *est généralement négligeable dans les solutions aqueuses.*

b) L'absorption diélectrique: l'équilibre chimique d'une solution dépend directement du champ électrique si le moment dipolaire électrique varie au cours de la réaction :

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial E}\right)_{P,T} = \frac{\Delta D^*}{RT} \qquad (I,4,2)$$

ΔD^* est appelée "polarisation" de la réaction ; elle est égale à la différence entre les polarisations partielles molaires des produits et des réactifs. On mesure l'absorption d'énergie par le système lorsque l'on applique un champ électrique E alternatif de fréquence N[13]. Cette technique est utilisée dans des domaines de temps de relaxation allant de 10^{-6}sec. à 10^{-10}sec.

B. Techniques utilisant une perturbation transitoire :

a) Perturbation de la pression : l'évolution de l'équilibre chimique est régie par la relation I,4,1.

α) Méthode du "saut de pression" (P-jump)[3-5]. Un récipient contenant la solution étudiée est isolé de l'extérieur par une membrane métallique. On le porte lentement à une pression de l'ordre de 20 à 50 atmosphères, jusqu'à éclatement de cette membrane. La pression appliquée à la solution, qui est recouverte d'un film mince de plastique, revient alors à la pression atmosphérique à la vitesse de déchirure de la membrane (10^{-5}sec.). Cette diminution de pression déclenche le balayage d'un oscilloscope par l'intermédiaire d'un détecteur piézoélectrique. Si la détection est la conductivité, on introduit généralement dans le récipient autoclave une deuxième cellule, de référence, contenant une solution ne relaxant pas et ayant une conductivité voisine de celle de la solution étudiée. Les deux cellules sont alors branchées dans deux bras différents d'un pont de conductivité.
Si la détection utilisée est l'absorption de la lumière ou la fluorescence, on utilise une seule cellule.

β) Méthode de "perturbation par onde de choc" (shock-wave) : on peut réaliser une variation de pression beaucoup plus brusque (0,1 μs) en utilisant les propriétés non linéaires de transmission

des ondes de pression dans les liquides pour redresser le front d'une onde de choc (compression adiabatique). On produit l'onde de choc en augmentant lentement la pression dans un petit réservoir obturé par une membrane métallique jusqu'à la rupture de cette dernière. L'onde de pression se propage alors dans un tube métallique rempli d'eau. Une colonne d'eau de 1,5 m est suffisante pour obtenir une bonne fonction escalier. Lorsque le front de l'onde arrive au fond de la cellule de mesure qui est fixée à l'extrémité du tube métallique, il y a réflexion, et l'onde retour provoque le doublement de la pression. On peut ainsi obtenir des pressions supérieures à 100 atmosphères avec un temps de montée de la perturbation de 10^{-7} seconde. A l'arrivée du front de l'onde de retour au dioptre eau-air, il y a à nouveau réflexion, avec cette fois-ci annulation de la pression (onde de raréfaction). Le processus se répète ainsi durant plusieurs aller-retour avant de s'atténuer complètement. La hauteur de la colonne d'eau détermine la durée de l'impulsion de haute pression dans la cellule. Cette durée doit être supérieure à celle du phénomène de relaxation étudié et fixe donc une limite supérieure aux temps de relaxation mesurables par cette méthode. (2ms si la hauteur de la colonne d'eau dans le tube est de 1,5 m). Là encore, différentes méthodes de détection sont utilisées : la conductivité[14], l'absorption lumineuse[15] ou la fluorescence (essais personnels effectués sur l'appareil en construction à Erlangen, Allemagne).

Une variante pour la production de l'onde de choc a été mise au point par HOFFMANN et PAULI[16] : une impulsion de pression d'une durée de 12 µs et de 25 atmosphères est produite par une membrane sous l'action d'un solénoïde. L'impulsion se propage alors à travers une colonne d'eau de 20 cm avant d'entrer dans la cellule de conductivité contenant la solution étudiée. Cet appareil permet seulement de mesurer des temps de relaxation de 1 à 10 µs, mais il a surtout le grand avantage de permettre de reproduire très rapide-

ment l'expérience, sans démonter une partie de l'appareil pour changer la membrane, comme c'est le cas pour l'appareil de perturbation par onde de choc décrit plus haut.

Au cours d'un stage au laboratoire du Dr. HOFFMANN à Erlangen en Allemagne, nous avons eu l'occasion de nous familiariser avec les deux dernières techniques décrites ; nous les avons en particulier utilisées pour l'étude des systèmes DNA - tilorone et DNA - hydroxystilbamidine.

b) Perturbation du champ électrique : La technique porte le nom de "saut de champ électrique" (E-jump)[6]. Le déplacement de l'équilibre chimique est provoqué par l'effet de dissociation sous l'action du champ électrique (2^{e} effet Wien) et la loi de Van't Hoff s'écrit dans ce cas sous la forme I,4,2. L'avantage de cette technique réside dans la facilité de pouvoir établir rapidement un champ électrique dans une solution ; la limitation vers les temps courts vient de la détection (30 ns).

Le saut de champ électrique est provoqué par la décharge d'un câble coaxial. Par exemple pour un câble de 1 km de long chargé sous 50 kV, la durée de l'impulsion est de 10 µs. On utilise généralement une détection optique.

c) Perturbation de la température : La technique s'appelle "saut de température" (T-jump) ; la construction d'un appareil utilisant ce principe et l'étude détaillée de cette technique font l'objet du prochain chapitre.

CHAPITRE II

CONSTRUCTION ET UTILISATION D'UN APPAREIL DE SAUT DE TEMPERATURE

II. 1. Généralités

La méthode du saut de température est certainement la technique faisant appel au concept de relaxation chimique qui a eu l'utilisation la plus large depuis sa première mise en application dans les années 1955-60 par EIGEN et ses collaborateurs[17]. Ce succès tient à plusieurs raisons :

- elle s'applique à un grand nombre de réactions, car la variable extensive reliée à la température est l'enthalpie (relation I,2,26) : or l'enthalpie de réaction est une grandeur thermodynamique rarement nulle ; de plus, on peut associer une variation d'enthalpie partielle à chaque étape de la réaction globale. Il n'en est pas de même pour les variables extensives de la pression ou du champ électrique. En effet, les changements de volume en solution exigent une variation de la solvatation entre réactifs et produits, et la polarisation l'existence d'un moment dipolaire électrique qui soit susceptible de varier au cours de la réaction, phénomènes qui sont moins généraux.

Parfois, la technique du saut de température est encore utilisable lorsque l'enthalpie de la réaction envisagée est nulle. Il convient alors de trouver un autre équilibre chimique que l'on puisse coupler à la réaction étudiée (par exemple une espèce chimique commune) et dont le temps de relaxation est beaucoup plus court. On a ainsi un "saut de concentration", qu'on appelle "saut de pH" si la réaction étudiée dépend du pH, et si l'on utilise un tampon dont la constante d'ionisation est sensible à la température[29].

- elle permet de travailler sur de petites quantités de solution (de 500 µl à 8 ml suivant les cellules utilisées)

- elle recouvre un domaine étendu de temps de relaxation, particulièrement riche en phénomènes de relaxation chimique, surtout en biologie.

Un appareil de saut de température comporte deux parties indépendantes :

- un système de chauffage de la solution
- un système de détection du signal de relaxation.

Depuis l'avènement de la méthode, les recherches technologiques se sont poursuivies dans différentes directions ; le système de chauffage habituel utilise la décharge d'un condensateur dans une solution conductrice (Effet Joule)[17]. Il permet de réaliser un temps de chauffage de l'ordre de la microseconde. Toutefois, il exclut l'étude de solutions non conductrices de courant, comme les solutions dans la plupart des solvants organiques, et les études en faible force ionique. Il exclut également, et pour la même raison, une détection par conductivité. On utilise généralement une détection optique : l'absorption[17,18,ce travail], la fluorescence[19,20,ce travail], la polarisation de fluorescence[20], le pouvoir rotatoire[2

la diffusion de la lumière[22]. Le spectrophotomètre habituel peut parfois être élégamment remplacé par un laser.

Une variante de cette méthode de chauffage a été mise au point par G. HOFFMANN en remplaçant le condensateur par un câble coaxial ; on obtient ainsi un temps de chauffe plus court (50 ns).
Pour pallier à l'impossibilité des systèmes précédents de chauffer des solutions non conductrices, des techniques de chauffage radicalement différentes ont été mises au point :

- le chauffage par micro-ondes[24,25] permet de réaliser des temps de chauffe de l'ordre de la microseconde ; une détection par conductivité est très sensible dans ce cas ; toutes les méthodes optiques citées plus haut sont également utilisables.

- le chauffage par impulsion laser de très haute puissance. Pour les solutions aqueuses, on utilise un laser émettant dans le proche infra-rouge, sur une bande d'absorption de l'eau[26,28]. Dans le cas général, on peut se servir de la bande d'absorption d'un colorant pour transférer l'énergie lumineuse dans la solution[27].
Cette technique très séduisante permet en principe de réaliser des temps de chauffage extrêmement courts (de l'ordre de la nanoseconde) et peut être utilisée sans conditions restrictives de force ionique ou de moyens de détection. Malheureusement, les conditions de chauffage sont tellement extrêmes que de nombreux phénomènes parasites apparaissent (cavitation, onde de choc, formation de plasmas) rendant la réalisation et l'utilisation d'un tel dispositif de chauffage extrêmement délicats. Les progrès dans ce domaine sont néanmoins constants et quelques études intéressantes ont été publiées[28]

Pour terminer ce tour d'horizon, citons la mise au point d'un appareil de saut de température lent[30], qui permet la mesure de temps de relaxation supérieurs à la seconde, limite supérieure des dispositifs précédents. La solution se trouve alors dans une microcuvette thermostatée par deux circuits indépendants et commutables.

II. 2. Appareillage.

Pour la réalisation d'un appareil de saut de température au laboratoire, notre choix a été guidé par plusieurs critères :

1) l'appareil devait être rapidement opérationnel, ce qui excluait une technologie de pointe telle que le chauffage par laser.

2) nous envisagions des études en solution aqueuse conductrice de de courant; il nous était donc possible d'utiliser un moyen de chauffage ayant fait ses preuves : la décharge d'un condensateur dans la solution.

3) l'appareil devait être très sensible, et dépasser les performances du seul appareil commercialisé au moment du début du travail, notamment par la mise au point d'un système de détection optique "double faisceau".

4) l'appareil devait permettre de suivre l'évolution des systèmes chimiques envisagés au moyen de différentes propriétés physiques; nous avons donc conçu une détection de l'absorption lumineuse dans le visible et dans l'ultraviolet, de la fluorescence, de la diffusion de la lumière et, très prochainement, de la polarisation de fluorescence. On peut en outre passer très rapidement d'un mode de détection à un autre, par simple commutation de quelques boutons.

A. Dispositif de chauffage.

La solution étudiée est placée entre deux électrodes reliées à un condensateur de capacité C chargé sous une tension V_o . La fermeture du circuit se traduit par le passage d'un courant i qui provoque l'échauffement total δT_∞ et le temps de chauffe τ_s .

En effet, la solution étudiée peut être considérée comme une résistance pure dans laquelle la décharge d'un condensateur donne lieu au courant

$$i = (V_o / R)\, e^{-t/RC} \qquad (II,2,1)$$

R *est la résistance du circuit de décharge* ($R \simeq R_c$, *résistance de la solution entre les électrodes de la cellule*) .

La variation de température, pour une solution de volume V , de chaleur spécifique c_p et de masse volumique ρ est alors :

$$\delta T = \int_o^t \frac{R\, i^2}{\rho\, V\, c_p}\, dt \qquad (II,2,2)$$

d'où $$\delta T(t) = \delta T_\infty \left(1 - e^{-\frac{2}{RC} t} \right) \qquad (II,2,3)$$

avec $$\delta T_\infty = \left(\frac{CV_o^2}{2}\right)\left(\frac{1}{V\rho c_p}\right)\frac{R_c}{R} \qquad (II,2,4)$$

Le temps de chauffe est défini par: $$\boxed{\tau_s = \frac{RC}{2}} \qquad (II,2,5)$$

C et R_c sont choisis de telle manière que τ_s soit égal à quelques microsecondes; en effet, pour les valeurs de τ_s plus courtes, l'intensité de l'onde de choc produite par le saut de température s'accroît considérablement (car les temps de dilatation de la solution sont de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-5} seconde); il y a alors cavitation, à moins de travailler à 4°C, lorsque l'eau est le solvant. D'autre part, C ne doit pas être trop faible, car il faudrait augmenter considérablement V_o pour obtenir une énergie capable de provoquer

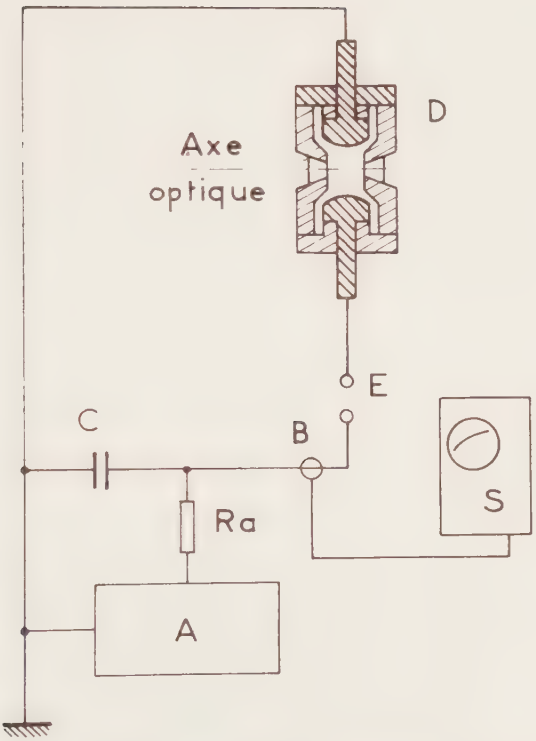


Figure II,1 : Schéma électrique du circuit de chauffage de l'appareil de saut de température : L'alimentation haute tension réglable A porte lentement le condensateur C à très haute tension. Le rapprochement mécanique des 2 éclateurs E provoque la décharge du condensateur C dans la cellule de mesure D dont la résistance est $R_c << R_a$. Le passage du courant de décharge dans la bobine inductive B provoque le déclenchement du balayage de l'oscilloscope S.

un saut de température de plusieurs degrés ; or des claquages électriques se produisent dans la cellule au-delà de 40 kV/cm.

Les condensateurs dont nous disposons ont des capacités de 0,01 µF, 0,02 µF et 0,05 µF ; les tensions nécessaires pour obtenir un saut de température de quelques degrés varient alors de 10 à 50 kV

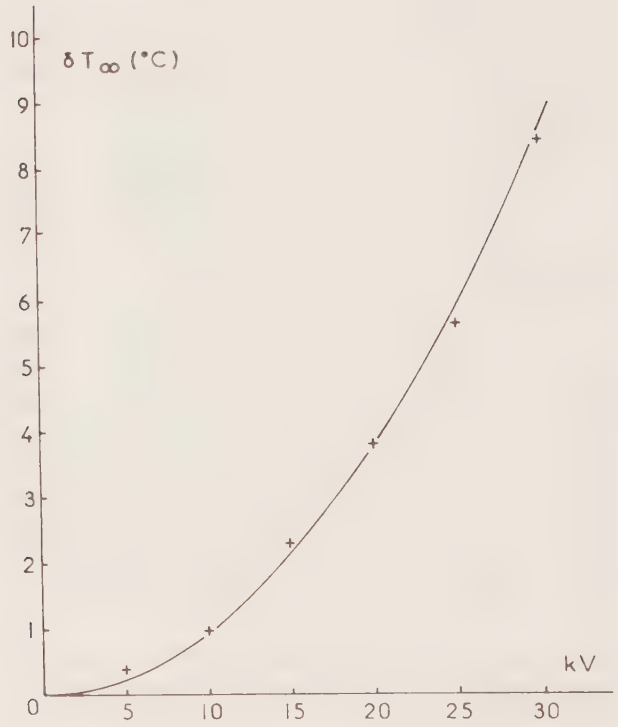


Figure II,2 : Variation du saut de température en fonction de la tension appliquée aux bornes d'une cellule en usage au laboratoire. La capacité du condensateur utilisé est C = 0,05 µF.

(*cf.* relation II,2,4). La résistance R_c est fixée par l'addition de sel de fond (KNO_3 ou NaCl) : on obtient ainsi, pour une solution 0,2 M, un temps de chauffe de 4 µs et pour une solution 0,02 M, un temps de chauffe de 25 µs (avec le condensateur de 0,05 µF).

La figure II,2 donne un exemple de courbe de variation de δT_∞, pour une cellule utilisée au laboratoire.

Le dispositif de chauffage, les cellules de mesure et les condensateurs de très haute tension ont été achetés à la Messanlagen Studiengesellschaft m.b.H., Göttingen. Le dispositif de chauffage comprend un circuit électronique de charge et de contrôle de la charge du condensateur, ainsi qu'un système mécanique (éclateurs) qui permet un déclenchement manuel de la décharge (figure II,1).

B. Cellules de mesure :

Les cellules de mesure (figure II,3) sont des versions commerciales de la Messanlagen Studiengesellschft m.b.H. Leurs principales caractéristiques sont :

Figure II,3 : Cellule de mesure de saut de température.

Cellules standard :

- 2 électrodes recouvertes d'or ou de platine et distantes de 2 cm
- corps en téflon ou en macrolon
- 2 fenêtres planes en quartz
- parcours optique : ℓ = 1 cm
- contenance : 8 ml

Microcellules :

- 2 électrodes recouvertes de platine et distantes de 1 cm
- corps en téflon
- 2 fenêtres planes en quartz
- parcours optique : ℓ = 7 mm
- contenance = 1 ou 2 ml

Microcellules spéciales pour la fluorescence :

Leurs caractéristiques sont identiques aux précédentes, sauf :

- corps en polyacétal noir (Dynal)
- 4 fenêtres planes en quartz

ou mieux :

- 2 fenêtres planes en quartz + 2 fenêtres "lentille" dont le foyer coincide avec le centre de la cellule ; pour ce type de cellule, le système optique d'émission a une ouverture de 0,75.

C. Porte-Cellule

Nous avons réalisé la boîte du porte-cellule de façon à pouvoir y loger toute l'optique nécessaire aux divers moyens de détection. Le porte-cellule proprement dit est essentiellement formé d'une jacquette de thermostatation métallique dans laquelle s'encastre la cellule. Cette jacquette est percée de quatre orifices destinés au passage de la lumière incidente ou fluorescente. L'électrode supérieure est reliée à la masse par contact avec le couvercle métallique. La majeure partie de la thermostatation se fait également par cette voie. L'impulsion de haute tension est appliquée

par l'électrode inférieure qui est isolée de la jacquette métallique par un corps en téflon. Dans ce dernier est fixée une tige verticale servant à positionner la cellule. Des canaux d'arrivée d'air sec aux quatre orifices optiques de la jacquette de thermostatation permettent d'éliminer l'eau de condensation sur les fenêtres de la cellule lors des expériences à basse température. L'ensemble du porte-cellule est relié à la masse du condensateur haute tension, mais isolé du boîtier du porte-cellule pour éviter des boucles de masse.

D. Montage optique

La détection optique permet actuellement des mesures de l'absorption lumineuse, de la fluorescence et de la diffusion de la lumière. D'autre part, afin d'éliminer au maximum les fluctuations de l'intensité lumineuse, nous avons conçu un système optique en double faisceau.

Dans la construction d'un spectrophotomètre rapide, un des critères les plus importants est le rapport signal sur bruit qui doit être optimum. Ce rapport, dans le cas de la spectrophotométrie d'absorption, est donné par la formule[7] :

$$\frac{S}{N} = \frac{1}{1,25}\left(\frac{\delta I}{I}\right)\left(\frac{I_o A_g S_\lambda}{2e_o \Delta f}\right)^{1/2} \cdot e^{-\varepsilon_i C_i \ell/2} \qquad (II,2,6)$$

où e_o *est la charge de l'électron,*
Δf *la bande passante du circuit électronique de détection,*
S_λ *la sensibilité de la photocathode,*
A_g *un facteur géométrique représentant le rendement de l'optique,*
et I_o *l'intensité lumineuse de la source.*

Le bruit est essentiellement du bruit Schottky produit par l'illumination constante de la photocathode des photomultiplicateurs. Le montage optique représenté par la figure II,4, a donc été conçu de façon à avoir un signal maximum.

a) Choix de la source lumineuse (recherche de I_o maximum) : Le paramètre important est ici la luminance (W/cm^2 x stéradian). Pour une puissance donnée, nous avons donc intérêt à choisir la source la plus ponctuelle possible. Ainsi, dans le visible, nous nous sommes servis avec succès d'une lampe à iode de 150 W, 24 V ; comme l'intensité lumineuse de ces lampes est proportionnelle à la 3^e ou à la 4^e puissance de la tension appliquée, une alimentation hautement stabilisée est nécessaire. On peut également utiliser un accumulateur.

Dans l'ultraviolet, il est nécessaire d'utiliser une lampe à arc. Nous avons monté sur l'appareil de saut de température une lampe au xénon-mercure Hanovia 200 W type 901 B-1 (19.000 Cd/cm^2). Cette lampe présente à la fois les avantages des lampes au mercure haute pression (présence de nombreux pics d'émission très intense répartis dans le spectre visible et ultraviolet) et ceux des lampes au xénon (spectre continu jusqu'à 250 nm). Cependant, dans de rares cas, il peut être bon de la remplacer par une lampe au xénon OSRAM 150 W/1 (15.000 Cd/cm^2). Cela peut facilement se faire, mais exige un nouvel alignement de l'optique.

La lampe à arc est alimentée par une alimentation METRONIC 102 CC (Göttingen), régulée en courant et en tension, et ayant une résiduelle alternative de 10^{-5} (200 µV pour 20 V). Les qualités de cette alimentation confèrent une telle stabilité à la lampe à arc qu'on préfèrera le plus souvent cette dernière à la lampe à iode.

Pour arriver à ce résultat, il a bien sûr été nécessaire de supprimer toutes les causes extérieures d'instabilité de l'arc,

1) par la mise sur amortisseur de toute la partie optique de l'appareil, et le choix d'une armature lourde pour donner une grande inertie au montage ; la partie optique est ainsi bien isolée des vibrations mécaniques provenant des transformateurs et du sol (trépidations de toutes sortes)
2) par l'éloignement de toute source alternative électromagnétique (alimentation H.T. par exemple pour éviter les oscillations de l'arc à 50 Hz ou à 100 Hz.

Le support des lampes a été conçu de façon à pouvoir passer instantanément de la lampe à arc à la lampe à iode, par simple glissement de ce support sur un rail muni de deux butées. En effet, quoique moins brillante, la lampe à iode peut être préférée dans le visible parce qu'elle est moins sensible aux instabilités mécaniques, électriques ou magnétiques que les lampes à arc et que,pour ces dernières, l'arc électrique subit des variations de position si le courant d'alimentation n'est pas parfaitement stable. Enfin, pour éliminer l'ozone produit par le rayonnement ultraviolet de la lampe à arc, nous avons installé une évacuation au-dessus du boîtier de la lampe au moyen d'un tuyau souple et d'un ventilateur. Le tuyau n'est pas fixé sur le boîtier pour éviter des vibrations nuisibles à la stabilité dues au ventilateur. Notons qu'il est préférable d'arrêter la ventilation si l'on veut travailler avec la lampe à iode, car l'écoulement continu de l'air sur les parois de la lampe perturbe le cycle de l'iode.

b) Montage optique en double faisceau : Les fluctuations lentes et les dérives éventuelles de la lampe abaissent considérablement le rapport signal sur bruit dans la région des balayages lents de l'oscilloscope (au-delà de 1 ms/cm). Ces fluctuations peuvent être facilement compensées par un montage "double faisceau", au prix d'une perte de lumière minime (de l'ordre de 15 %) dans la cellule de mesure. Aussi avons-nous placé dans le faisceau lumineux, avant l'entrée de la cellule de mesure, une lame en quartz d'épaisseur 1 mm et faisant un angle de 45° avec l'axe optique. La lumière réfléchie par cette lame arrive sur un photomultiplicateur de référence dont le signal est amplifié et soustrait de celui du photomultiplicateur de mesure. Lorsque les signaux de référence et de mesure sont égaux, leur différence élimine en principe toutes les fluctuations et la dérive de la lampe, mais le signal de relaxation chimique, propre au faisceau de mesure,subsiste. En fait, dans des conditions d'éclairement données, les fluctuations et les oscillations résiduelles sont souvent éliminées pour une valeur du signal différencié non nulle. Ceci n'est pas gênant, car il suffit de chercher l'amplification du signal de référence qui donne la bonne compensation en observant l'évolution de la "propreté" du signal différencié sur l'oscilloscope. Mais nous avons été obligé de supprimer les dérives lentes à l'aide d'un filtre de dérive qui sera décrit plus loin (§ I,2,E).

La compensation du système double faisceau ne serait pas toujours suffisante si les fluctuations de l'intensité lumineuse n'étaient pas minimes. En effet, supposons que le signal comporte deux temps de relaxation, le premier, court, de grande amplitude, et le second, long, de faible amplitude ; si nous voulons mesurer le deuxième temps, la variation de lumière du faisceau de mesure due à l'évolution du système chimique après le saut de température va faire sortir le

signal différencié de son domaine de bonne compensation, et l'observation du dernier temps de relaxation à une grande sensibilité va être gênée par les fluctuations de la lumière incidente. Un cas semblable se rencontre assez souvent lorsqu'on utilise une détection par fluorescence : le saut de température peut alors engendrer une variation du signal de mesure supérieure à 10 %, si le rendement quantique est fortement dépendant de la température.

c) Optimisation de la géométrie de l'optique (recherche de A_g maximum) : Dans un spectrophotomètre rapide, la transmission de toutes les pièces optiques doit être maximale. De plus, le montage doit comporter le moins de lentilles possible, afin d'éviter trop de pertes par réflexion (ou par absoption par le quartz dans l'U.V. relativement lointain). Dans la description qui suit, nous utiliserons les notations de la figure II,4. Pour récupérer la lumière à l'arrière de la lampe, nous avons monté un miroir concave M_1 de distance focale f = 45 mm qui refocalise la lumière émise vers l'arrière sur la source. La lumière totale est focalisée sur la fente d'entrée D_1 du monochromateur par un condenseur L_1 d'ouverture 1.

Le monochromateur a été choisi de façon à avoir un grand rendement lumineux plutôt qu'une bonne dispersion (monochromateur Bausch et Lomb) ; en effet les phénomènes de relaxation se voient généralement dans un assez grand domaine de longueurs d'onde, et souvent il est même judicieux d'ouvrir les fentes du monochromateur pour avoir un meilleur rapport S/N. Nous faisons cependant une réserve : l'exploitation quantitative des amplitudes exige une bonne connaissance des coefficients d'extinction, donc une bonne monochromie. Il faut alors chercher un compromis entre le rapport S/N et la monochromie en fermant plus ou moins les fentes D_1 et D_2.

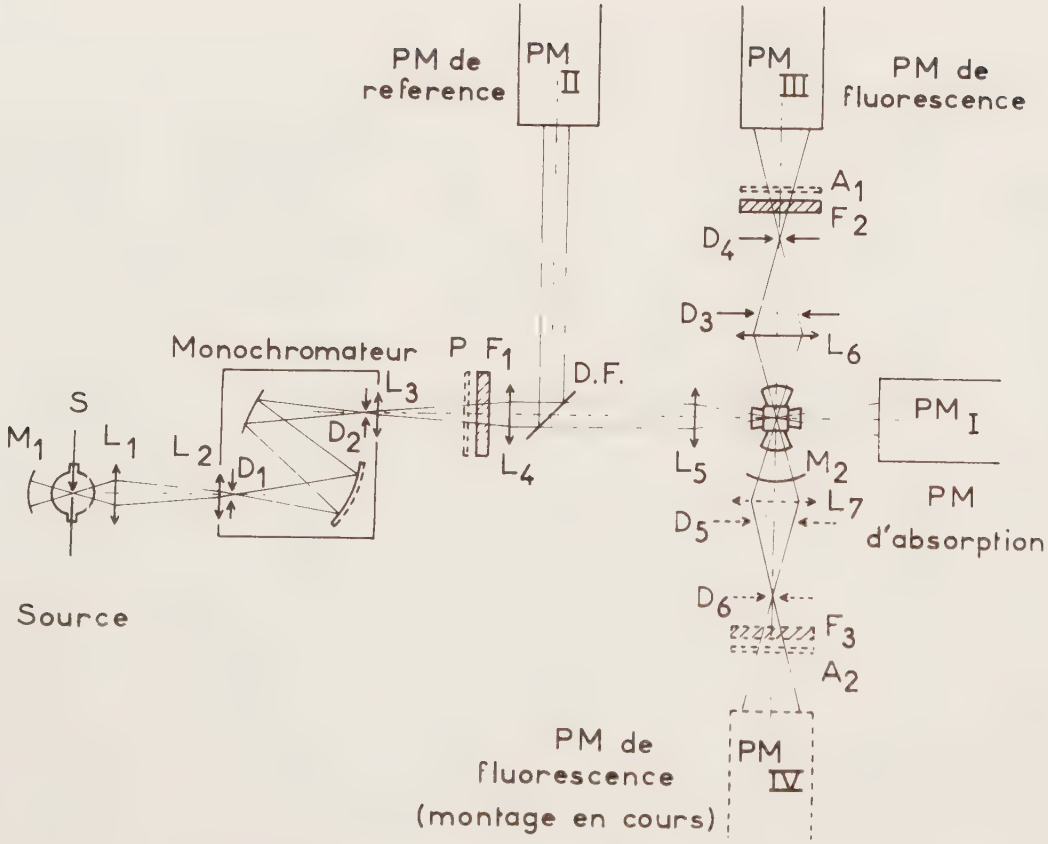
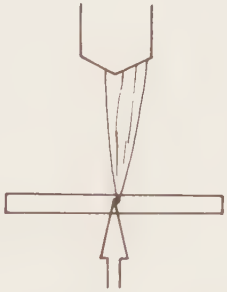


Figure II,4 : Montage optique de l'appareil de saut de température : A_i : analyseurs ; M_1, M_2 : miroirs concaves ; L_i : lentilles en quartz ; D_1,D_2 : fentes variables ; D_3 à D_6 : fentes fixes ; D.F.:diviseur de faisceau; F_i :filtres optiques ; P : polariseur.

Ainsi que le suggère RABL, le monochromateur est placé dans le montage de manière que ses fentes soient horizontales, c'est-à-dire perpendiculaires à l'axe de la lampe. Ceci permet de réduire l'influence d'un éventuel déplacement de l'arc sur l'intensité du faisceau lumineux (fig.II,5).

Position de la fente verticale : l'image de l'arc peut sortir de la fente.



Position de la fente horizontale : la partie d'image de l'arc considérée (point chaud) reste dans la fente.

Figure II,5 : Influence de la position de la fente d'entrée du monochromateur sur la stabilité du faisceau lumineux.

Le filtre F_1 sert à éliminer la lumière parasite sortant du monochromateur ; ainsi, lorsqu'on travaille dans l'U.V., on peut mettre un filtre coupant la lumière visible. Le faisceau lumineux est ensuite envoyé sur le diviseur de faisceau par la lentille L_4. Cette dernière est déplaçable suivant l'axe optique pour corriger la variation chromatique des distances focales. La partie réfléchie du faisceau arrive sur le photomultiplicateur de référence et la partie transmise sur la lentille L_5.

- Dans le cas de la détection par absorption lumineuse, le

faisceau émergent attaque directement le photomultiplicateur de mesure.

- Dans le cas de la détection par fluorescence, une lentille L_6 focalise la lumière émise à 90° du faisceau incident sur une fente D_4 ; les fentes D_3 et D_4 éliminent la lumière parasite réfléchie par le boîtier de la cellule. Le filtre F_2 élimine la lumière diffusée par la solution ; dans le cas d'une mesure par diffusion de la lumière, on ne met donc pas de filtre F_2. Le faisceau arrive alors sur le"photomultiplicateur de mesure de fluorescence". La lumière fluorescée dans la direction opposée est récupérée par un miroir M_2. Les photomultiplicateurs I et II (absorption et référence) sont des 150 UVP de la Radiotechnique à cathode S-13. Ils ont été choisis pour leur bonne sensibilité dans le bleu et dans l'U.V. (facteur S_λ dans la relation II,2,6).
Le photomultiplicateur III (et IV) de mesure de fluorescence est un EMI 9558 QA à cathode S-20 pour U.V. trié en bruit Schottky et de grande sensibilité de l'U.V. lointain au rouge. Pour les mesures de fluorescence, il donne un rapport S/N quatre fois plus grand que celui obtenu avec le 150 UVP de la Radiotechnique. Tous les photomultiplicateurs sont entourés d'un blindage en µ-métal afin de les isoler de toute influence magnétique extérieure.

Les filtres F_1 et F_2 sont des filtres CORNING interchangeables sans aucun démontage. Le filtre F_2 peut encore être remplacé par un filtre interférentiel (SCHOTT).

Sur la figure II,4 nous avons représenté en pointillé une extension en cours du dispositif qui vient d'être décrit. L'adjonction d'un

photomultiplicateur PM_{IV}, symétrique à PM_{III}, permettra :

1) d'augmenter le rapport S/N par un facteur $\sqrt{2}$ en détection par fluorescence (par rapport à la détection avec un seul photomultiplicateur sans miroir M_2).
2) de suivre les variations de la polarisation de fluorescence en fonction du temps en ajoutant au montage le polariseur P et les analyseurs A_1 et A_2.

Tous les éléments optiques sont montés dans différents boîtiers fixés sur des bancs d'optique, permettant ainsi un démontage et un remontage rapide en cas de modifications ou de réglages.

E. Unité d'amplification et de contrôle du signal.

Pour avoir un rapport signal sur bruit important, l'appareil de saut de température doit toujours être utilisé dans des conditions optimales de lumière. L'éclairement de la photocathode des photomultiplicateurs peut donc varier considérablement d'une expérience à l'autre (dans un rapport de l'ordre de 1.000 pour l'absorption, supérieur à 100.000 pour la fluorescence). Ces grandes variations du photocourant rendent nécessaire l'utilisation d'un nombre de dynodes adapté à chaque cas. Nous avons donc réalisé, pour chaque photomultiplicateur, une commutation des dynodes placée dans le boîtier du photomultiplicateur et permettant de travailler avec 2 à 11 dynodes.

Le schéma électrique de l'unité d'amplification et de contrôle est représenté par la figure II,6. Les signaux des photomultiplicateurs de mesure et de référence sont amplifiés au moyen de deux

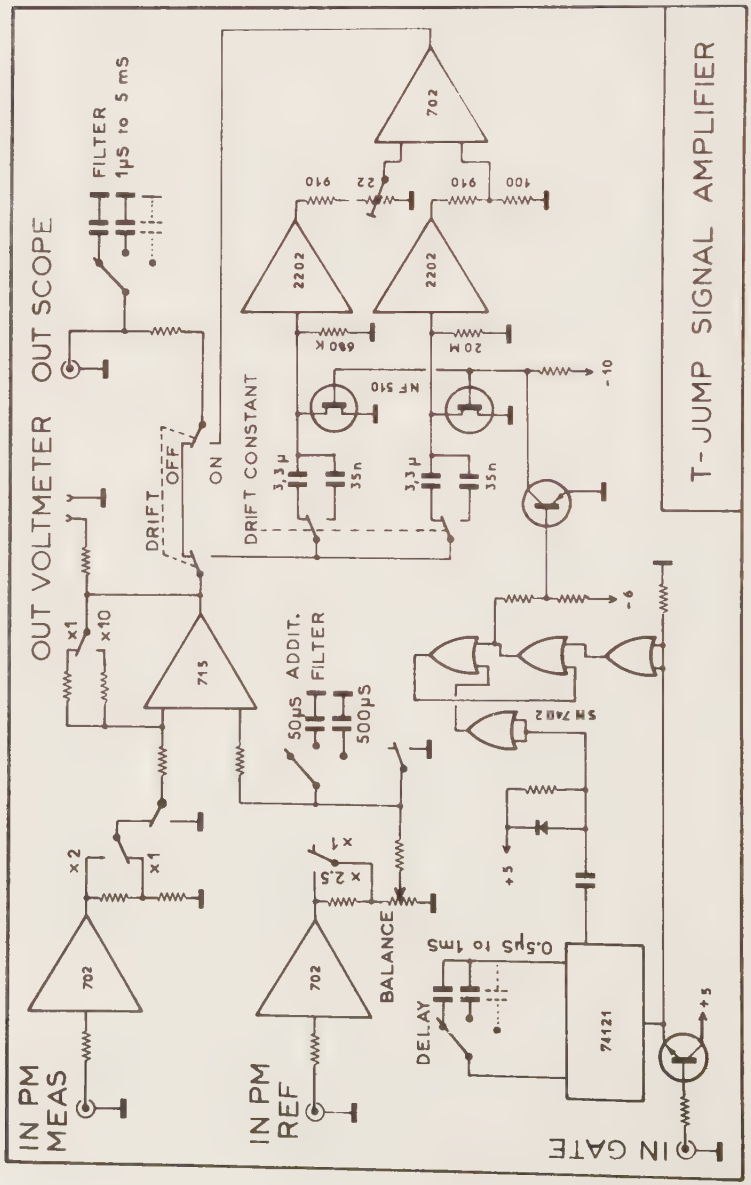


Figure II,6 : Schéma électrique de l'unité d'amplification et de contrôle du signal.

amplificateurs opérationnels. Le circuit de référence possède un gain variable. Un troisième amplificateur opérationnel fait la différence des deux signaux précédents et amplifie dix fois cette différence. Ainsi, si nous choisissons l'ouverture des fentes du monochromateur, le nombre de dynodes, la tension appliquée aux photomultiplicateurs et le gain du premier étage de l'amplification du circuit de mesure de façon à avoir 1 Volt de signal, nous avons une variation de signal correspondant à un signal total de 10 Volts à la sortie de l'amplificateur différentiel. La valeur du signal différencié et amplifié est affichée sur un voltmètre de contrôle. Ce signal est ensuite envoyé dans un filtre de dérive (passe-haut), puis dans un filtre RC (passe-bas) réglable par plots à des valeurs de constantes de temps d'amortissement de 1 µs à 5 ms ; on peut ainsi minimiser le facteur Δf de la relation II,2,6. Le signal est finalement enregistré sur un oscilloscope à mémoire (TEKTRONIX 549) branché en D.C.

Le filtre de dérive est un circuit AC amélioré autocommutable dont le principe est analogue à celui qui a été imaginé par RABL. Tant que l'oscilloscope ne balaye pas, la constante de temps du filtre est très petite (1 µs) et le signal est donc nul (V=0, tension de départ du signal de relaxation).
Au moment du saut de température, la porte de l'oscilloscope commute la constante de temps du filtre à une valeur nominale choisie, grande devant la vitesse de balayage de l'oscilloscope. Nous obtenons ainsi sur l'écran une relaxation qui débute toujours à une tension bien définie (V=0), et nous n'avons pas besoin de nous préoccuper des dérives du signal dues aux variations d'intensité lumineuse ou d'absorption.

En principe un couplage AC ayant une fonction caractéristique $F(t) = e^{-t/\tau}$ convient, si τ est très grand vis-à-vis du temps de relaxation chimique (si le signal est f(t), on aura S = f(t) x F(t)). Cependant,pour les balayages lents, une telle fonction F(t) est difficilement réalisable et ne conviendrait pas. Aussi avons-nous réalisé un circuit de fonction caractéristique

$$F(t) = e^{-t/\tau_1} - Ae^{-t/\tau_2} ,$$

A , τ_1 et τ_2 étant choisis de manière telle que le début de la courbe représentant F(t) puisse être assimilé à une horizontale ($F(t) \approx 1$) pendant 20 ms ou 2 s (figure II,7). Les erreurs introduites dans le signal par le filtre sont ainsi négligeables.

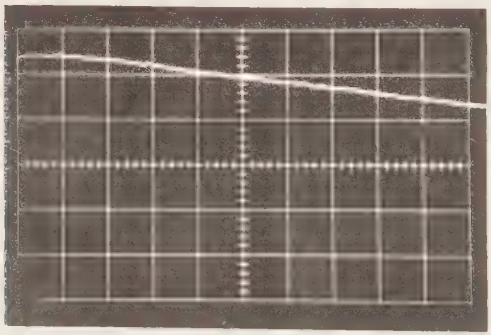


Figure II,7 : Fonction caractéristique F(t) obtenue pour la valeur nominale 20 ms du filtre de dérive. Echelle horizontale : 20 ms/cm

Enfin une ligne de retard réglable permet de différer l'ouverture du filtre de dérive. Nous pouvons ainsi supprimer les débuts des courbes correspondant à des phénomènes parasites — électroluminescence, cavitation, changement de rendement quantique de fluorescence — ou à un temps de relaxation court de grande ampli-

tude, lorsqu'on veut mesurer un temps de relaxation plus long, mais d'amplitude plus faible. La partie utile du signal démarre ainsi à une tension nulle.

Nous avons déjà parlé des avantages du montage optique en double faisceau qui annule les irrégularités du signal dues aux fluctuations lentes de la lumière (§ II,2,D,b). Pour la mesure des relaxations rapides (τ<500 µs) où Δf est grand, ce montage entraîne néanmoins une augmentation du bruit qui est alors la somme aléatoire des bruits de deux photomultiplicateurs. Pour minimiser cet inconvénient, nous avons placé un filtre RC dans le circuit du signal de référence avant que ce dernier ne soit soustrait au signal de mesure (valeurs des constantes de temps d'amortissement τ_{add} : 50 µs et 200 µs). Le bruit du signal différencié provient alors essentiellement du PM de mesure. On ne peut malheureusement pas donner à τ_{add} des valeurs supérieures à 200 µs, car on créerait un déphasage entre les signaux de mesure et de référence dans des domaines de fréquence où des fluctuations de la lumière peuvent apparaître (100 Hz en particulier), et on rendrait la compensation double faisceau inefficace.

Tableau II,1

Performances de l'appareil de saut de température dans sa version actuelle à différentes longueurs d'onde, et pour différentes valeurs de la constante d'amortissement du bruit.

Absorption

Monochromateur	λ	Constante de temps d'amortissement	S/N
Réseau U.V.	265 nm	1 µs	1.300
		100 µs	5.000
		5 ms	20.000
	365 nm	1 µs	1.400
		50 µs	5.000
		5 ms	25.000
Réseau visible	365 nm	1 µs	3.000
		100 µs	7.000
		5 ms	25.000
	546 nm	1 µs	2.000
		100 µs	10.000
		5 ms	25.000

Fluorescence (Acridine-Orange-DNA), λ d'excitation : 313 nm

Cste de temps d'amortissement	S/N
1 µs	500
100 µs	2.000
5 ms	5.000

Le tableau II,1 donne les performances actuelles de l'appareil ; les rapports S/N qui y figurent sont à multiplier par l'amplitude du signal pour obtenir le rapport signal sur bruit S'/N de la relaxation considérée. On peut ainsi arriver à des valeurs de S'/N de l'ordre de 5.000 dans de très bonnes conditions. Généralement ce rapport est plus petit, mais même avec une valeur S'/N = 5, la courbe est encore exploitable. Nous avons ainsi exploité valablement des relaxations dont l'amplitude du signal était inférieure à 0,0005.

II. 3. Utilisation de l'appareil de saut de température :

L'appareil de saut de température permet souvent des études dans lesquelles on peut utiliser indifféremment divers moyens de détection.
Dans les études cinétiques qui font l'objet de ce travail, nous nous sommes essentiellement servis des techniques de spectrophotométrie d'absorption et de fluorescence dont nous allons donner brièvement les caractéristiques respectives. Enfin, nous indiquerons les précautions à prendre pour une utilisation optimale de l'appareil.

A. Mesures par absorption lumineuse :

Si, dans la solution étudiée, seule l'espèce i absorbe la lumière la loi de Beer-Lambert conduit, pour une perturbation de faible amplitude de l'équilibre chimique ($|\delta C_i| << \overline{C}_i$), à la relation

$$\frac{\delta I(t)}{\overline{I}} = - \varepsilon_i \, \ell \, \delta C_i(t) \qquad (II,3,1)$$

où ε_i est le coefficient d'extinction de l'espèce i (le coefficient d'extinction décadique généralement utilisé s'écrit $\varepsilon'_i = \varepsilon/2,303$) ,
ℓ est le chemin optique dans la cellule en cm,
$\overline{I}$ est l'intensité du faisceau émergent à l'équilibre,
$\delta I(t)$ la variation d'intensité du faisceau émergent par rapport à $\overline{I}$ au temps t,
$\delta C_i(t)$ est la variation de concentration de l'espèce i par rapport à $\overline{C}_i$ au temps t.

La variation relative de l'intensité lumineuse est donc directement proportionnelle à la variation de concentration. Pour cal-

culer la densité optique correspondant à un rapport S/N maximum, il suffit d'optimiser la relation II,2,6 par rapport à ε :

$$\frac{\partial \ln S/N}{\partial \varepsilon} = 0 = \frac{1}{\varepsilon_i} - \bar{C}_i \frac{\ell}{2}$$

d'où : $\varepsilon_i \bar{C}_i \ell = 2.$

Comme $\varepsilon_i = 2{,}3\varepsilon'_i$, la densité optique optimum, $D.O._{opt.}$, est :

$$\boxed{D.O._{opt} = 0{,}868} \qquad (II,3,2)$$

Cette relation fixe la concentration de l'espèce absorbante. En fait, il est rarement possible de travailler à $\bar{C}_i$ constant. En effet, les variations de concentration donnent de précieux renseignements sur le mécanisme réactionnel et permettent de déterminer les constantes de vitesse (voir chapitre I).
L'appareil décrit plus haut permet de mesurer des relaxations dans des solutions dont la densité optique varie de 10^{-2} à 4.
La figure II,8 [20] donne la variation du rapport S/N en fonction de la densité optique utilisée dans un cas simple. Il n'est pas nécessaire de choisir la longueur d'onde correspondant au maximum du pic d'absorption, car on peut se placer au bord de la bande d'absorption pour les fortes concentrations de manière à ce que la densité optique soit voisine de 0,87 (par exemple).

B. Mesures par fluorescence.

Dans le cas des solutions de faible densité optique, nous pouvons négliger l'effet de filtre de la solution pour la lumière d'excitation. L'intensité de fluorescence I_f est alors proportionnelle

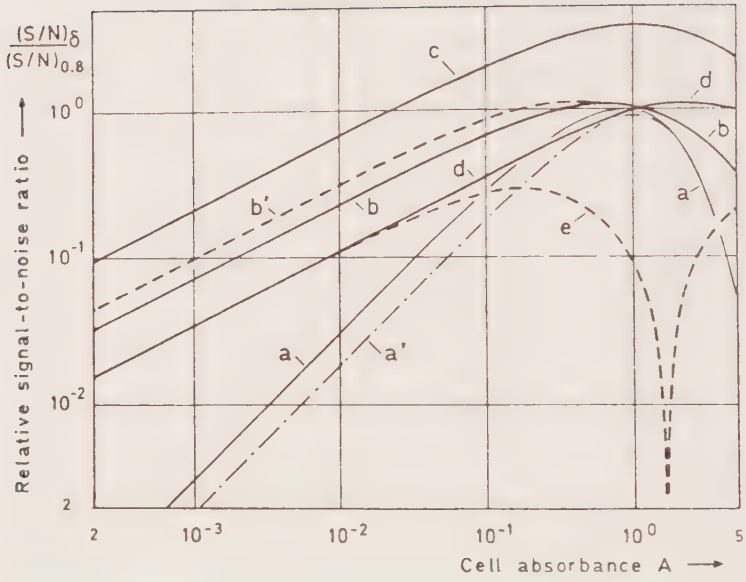


Figure II,8 : Rapport signal sur bruit des mesures de saut de température en fonction de la densité optique A pour une variation δA/A donnée, normé pour le maximum du rapport signal sur bruit $(S/N)_{0,8}$ *obtenu avec des mesures d'absorption pour A = 0,868. Les calculs sont effectués pour deux espèces fluorescentes avec des concentrations à l'équilibre* $C_1 = C_2$ *et des variations de concentration* $\delta C_1 = -\delta C_2$.

Absorption : a/ $(S/N)_\delta$ *d'après les équations II,2,6 et II,3,1*

a'/identique à a/ en ajoutant du bruit sur le signal de référence

Fluorescence: b/$(S/N)'_\delta$ *d'après l'équation II,2,6 et l'équation II,3,4 généralisée, pour des rendements quantiques* $\Phi_1 = 0,7$ *et* $\Phi_2 = 0,25$, *et un rapport des coefficients d'extinction* $\varepsilon_1/\varepsilon_2 = 1,4$.

b'/ identique à b/ en rajoutant un miroir concave derrière la cellule de mesure.

c/ identique à b/ mais avec $\varepsilon_1/\varepsilon_2 = 1,1$

d/ identique à b/ mais avec $\varepsilon_1/\varepsilon_2 = 0,7$

e/ identique à b/ mais avec $\Phi_1 = 0,5$ *et* $\Phi_2 = 0,45$

(d'après RIGLER, RABL, et JOVIN[20]*)*

à la lumière absorbée par la substance fluorescente

$$I_f = C^{ste} \times I_o \left(1 - e^{-(\varepsilon_{\lambda_e} + \varepsilon_{\lambda_f}) C_i \ell} \right) \qquad \text{(II,3,3)}$$

ε_{λ_e} *est le coefficient d'extinction à la longueur d'onde d'excitation*

ε_{λ_f} *est le coefficient d'extinction à la longueur d'onde d'émission.*

Pour une perturbation faible de l'équilibre chimique, cette relation conduit à :

$$\frac{\delta I_f(t)}{\bar{I}_f} = \frac{\delta C_i(t)}{\bar{C}_i} \qquad \text{(II,3,4)}$$

La variation relative de l'intensité de fluorescence est donc proportionnelle à la variation relative de concentration. La fluorescence peut donc être préférée à l'absorption si la densité optique de la solution est faible. Ainsi, l'appareil de saut de température que nous avons mis au point nous a permis de mesurer des relaxations avec des solutions contenant seulement des traces de colorant fluorescent (chapitre IV). Rigler et coll.[20] ont utilisé la relation II,2,6 et une expression de $\delta I_f / \bar{I}_f$ plus générale que II,3,4 pour calculer le rapport signal sur bruit en fonction de la densité optique dans différentes conditions. Ces résultats sont reproduits dans la figure II,8.

La détection par fluorescence a d'autres avantages : elle est sélective, et peut être utilisée pour suivre la variation des seules espèces qui fluorescent, simplifiant ainsi l'exploitation des résultats dans de nombreux cas ; elle peut également permettre la détection de phénomènes de relaxation qui ne font pas varier

la densité optique, mais dans lesquels le rendement quantique de fluorescence est modifié (voir chapitre IV).

C. Modalités d'utilisation de l'appareil de saut de température

L'utilisation du dispositif de saut de température exige un certain nombre de précautions lorsque l'on désire un usage rationnel et optimal, et une bonne reproductibilité des expériences. Certaines de ces précautions relèvent de la "recette". Par contre, les utilisateurs de l'appareil se doivent de connaître celles que nous allons rapidement énumérer ci-dessous.

Source lumineuse :

- En alimentant la lampe en surcourant, on peut augmenter sa stabilité, mais au détriment de sa durée de vie. Ce procédé doit donc être utilisé seulement lorsque la stabilité lumineuse est insuffisante, ce qui peut arriver pour les relaxations lentes.

- La proximité d'un aimant permanent (agitateur magnétique par exemple) permet parfois de stabiliser la position de l'arc de la lampe.

- Toutes les fluctuations aléatoires lentes peuvent être quasiment supprimées pendant environ 30 secondes, par l'obturation de toutes les ouvertures du boîtier de lampe pouvant donner lieu à une circulation d'air.

- Il est souhaitable de couper le faisceau lumineux entre chaque mesure au moyen d'un obturateur, car la grande intensité lumineuse du faisceau fatigue le réseau du monochromateur, la solution et les photocathodes des photomultiplicateurs.

Réglage de l'optique :

- Il est bon de procéder à un réglage du montage optique chaque fois que l'on remplace la lampe. Ce réglage se fait à partir de la lampe, élément par élément.

Réglage du monochromateur :

- Nous avons déjà parlé du choix de l'ouverture des fentes au § II,2,D,c. Dans les cas où les deux réseaux (visible et U.V.) sont utilisables indifféremment (entre 350 et 400 nm), on

obtient le maximum de lumière avec le réseau "visible", au détriment de la dispersion.

- Si le spectre d'absorption de la solution étudiée le permet, on a intérêt à choisir une longueur d'onde correspondant à un pic d'émission du mercure.

Solutions étudiées :

- Il est souvent nécessaire de dégazer les solutions avant de les introduire dans la cellule ; on diminue ainsi les phénomènes de cavitation et la formation de bulles au moment de la décharge électrique.

Contrôle de la température :

- Pour chaque cellule, nous avons établi la courbe d'étalonnage donnant la variation de température δT_∞ en fonction de la tension de charge du condensateur haute tension (exemple figure II,2). Ces étalonnages ont été effectués soit à l'aide d'un indicateur de pH (rouge de phénol) et d'un tampon dont le pK dépend de la température (glycyl-glycine), soit avec le système Proflavine-DNA. Ils vérifient bien la relation II,2,4.

- Entre deux sauts de température, il est nécessaire d'attendre environ 5 minutes pour laisser revenir la solution à sa température initiale.

- La cellule est constituée de matériaux isolants à l'exception des électrodes servant à obtenir la décharge haute tension. La thermostatation s'effectue principalement par l'intermédiaire de l'électrode supérieure (voir § II,2,C). Lorsque la température de travail est très différente de celle du milieu ambiant, il s'établit au sein de la cellule un gradient de température entre les deux électrodes. La température qu'il importe de connaître est celle de la région centrale, où la solution est traversée horizontalement par un faisceau étroit de lumière monochromatique. Nous avons donc étalonné la différence de température entre cette région centrale et l'électrode supérieure en fonction de la température de l'électrode (figure II,9). Cette dernière a été percée d'un canal pour pouvoir y insérer une thermistance.

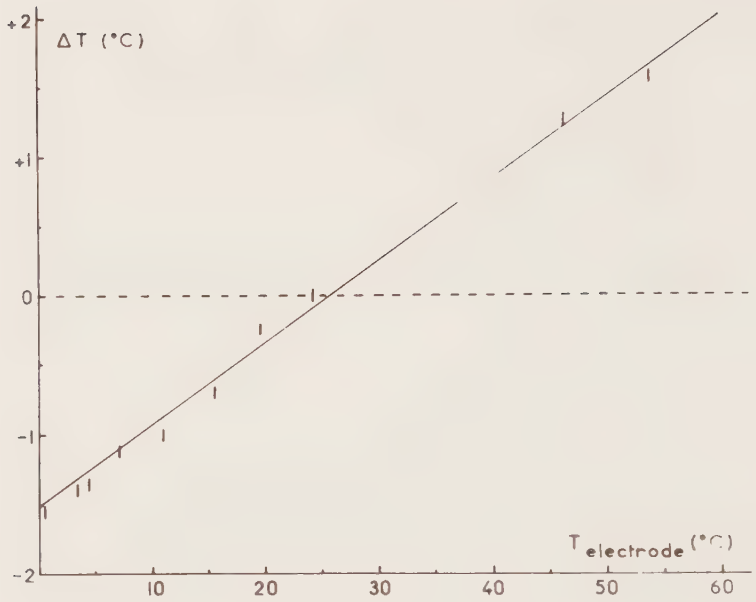


Figure II,9 : Différence de température ΔT entre la partie centrale de la cellule de mesure (microcellule) et l'électrode supérieure en fonction de la température T de l'électrode supérieure (température ambiante : 25,5°C).

- La connaissance des trois paramètres

$$\begin{cases} \delta T_{\infty} = f(kV) \\ T_{électrode} = f(R_t) \qquad (R_t = \text{résistance de la thermistance}) \\ \text{et } \Delta T = f(T_{électrode}) \end{cases}$$

permet de contrôler la température finale du saut de température à environ 0,1°C près.

Filtres électroniques :

- Les filtres passe-haut et passe-bas ont été conçus pour améliorer le rapport S/N et pour faciliter l'utilisation de l'appareil ; il faut néanmoins veiller à ce qu'ils ne modifient pas l'allure du signal, en particulier qu'ils ne changent pas la valeur des temps de relaxation.

- Ainsi le temps de montée du filtre RC doit être au moins dix fois, et si le rapport S/N le permet, 50 ou 100 fois plus court que le temps de relaxation étudié.

- En ce qui concerne le filtre de dérive, les deux valeurs nominales disponibles donnent une fonction horizontale $F(t) \simeq 1$ pour les balayages de l'oscilloscope suivants :

5 µs/cm à 2 ms/cm

et 1 ms/cm à 0,2 s/cm

Toutefois, pour des balayages rapides (≤20 µs/cm), l'ouverture de la porte de l'oscilloscope induit des oscillations parasites dans le signal. On peut alors utilement se passer du filtre de dérive et se servir du couplage AC de l'oscilloscope.

- Le filtre additionnel du circuit de référence peut être enlevé lorsque le filtre passe-bas global a une valeur du temps de montée qui lui est supérieure ; on évite ainsi tout déphasage éventuel entre signaux de mesure et de référence.

II. 4. Mise au point d'un simulateur pour l'exploitation des courbes de relaxation.

Il y a différentes manières d'exploiter les courbes de relaxation. La plus simple et la plus immédiate est une exploitation manuelle point par point. Mais ce procédé fait perdre un temps considérable, étant donné le grand nombre de courbes de relaxation nécessaires à la détermination d'un mécanisme réactionnel. Aussi avons-nous envisagé très rapidement la mise au point de techniques plus automatisées.

Après avoir exposé la méthode manuelle, nous présenterons une technique d'exploitation utilisant la comparaison des courbes de relaxation avec des courbes simulées au moyen d'un générateur de somme d'exponentielles mis au point au laboratoire. Nous conclurons ce paragraphe par quelques idées prospectives dans le domaine de l'utilisation des techniques transitoires de relaxation chimique.

1) Exploitation manuelle :

Nous avons vu au chapitre I qu'une courbe de relaxation est représentée par une équation de la forme

$$\delta P(t) = \sum_i A_i e^{-t/\tau_i} \qquad \text{(II,3,5)}$$

où A_i *est l'amplitude totale associée au temps de relaxation* τ_i *et* $\delta P(t)$ *l'amplitude instantanée du signal de relaxation.*

Nous pouvons alors écrire :

$$\log\left(\delta P(t) - \sum_{i\neq j} A_i e^{-t/\tau_i}\right) = \log A_j - t/\tau_j \qquad (II,3,6)$$

Lorsque les temps de relaxation sont très différents, et lorsque $\tau_j >> \tau_i$, $\forall i \neq j$, la quantité $\sum_{i\neq j} A_i e^{-t/\tau_i}$ peut être négligée devant $\delta P(t)$ pour $t \geqslant \tau_j$. $\log \delta P(t)$ varie alors linéairement avec t, et on peut en déduire A_j et τ_j. En refaisant le même raisonnement sur la quantité $\left(\delta P(t) - A_j e^{-t/\tau_j}\right)$, on peut déterminer A_k et τ_k, τ_k étant le temps de relaxation qui suit τ_j dans l'ordre des durées décroissantes. On arrive ainsi de proche en proche à connaître tous les temps et toutes les amplitudes de relaxation.

En pratique, les courbes de relaxation enregistrées sur l'écran de l'oscilloscope sont photographiées à l'aide d'un appareil Polaroïd C12-Tektronix. On trace l'asymptote sur la photo et on reporte point par point la variation de l'amplitude de relaxation en fonction du temps sur un papier semi-logarithmique (figure II,10). Si le signal ne comporte qu'un seul temps de relaxation, la valeur absolue de la pente de la droite obtenue représente l'inverse du temps de relaxation et l'ordonnée à l'origine donne la valeur de son amplitude. Si le signal comporte plusieurs temps de relaxation et si les temps sont très différents, la courbe est une droite pour t grand ; cette droite donne la valeur et l'amplitude du temps long. On fait ensuite la différence entre la valeur du signal $\delta P(t)$ et l'ordonnée de la droite correspondant à la variation d'amplitude du temps long, pour toutes les valeurs du temps t. On exploite la courbe obtenue comme la première et ainsi de suite de proche en proche. La figure II,10 donne un exemple d'exploitation d'un signal comportant trois temps de relaxation.

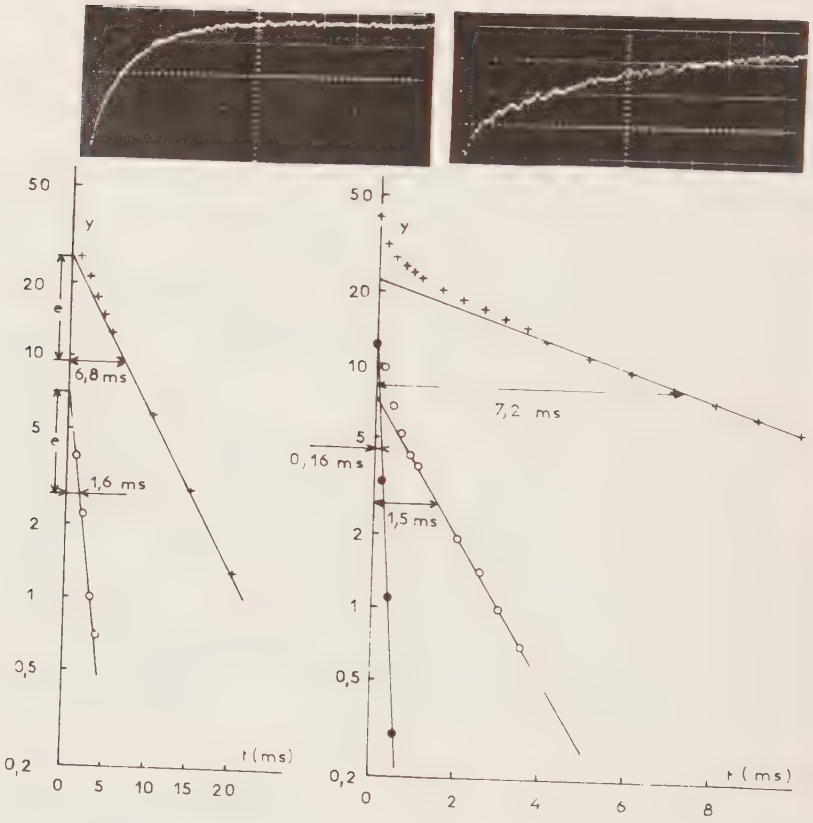


Figure II,10 : Exemple d'exploitation manuelle d'un signal comportant trois temps de relaxation.
Système tilorone -DNA : μ = 0,1 , r = 0,1, λ = 265 nm, ΔT = 6,5°C.

L'intérêt de cette méthode d'exploitation, que nous avons utilis
concurremment à celle qui fait appel à la simulation, réside dan
la possibilité de déterminer immédiatement les paramètres du si-
gnal (avantage du film Polaroïd).

2) Exploitation par simulateur analogique :

Le principe de cette méthode est le suivant : les photos (film 24 x 36 mm) des signaux de relaxation sont projetées sur l'écran d'un oscilloscope sur lequel on simule une fonction correspondant à une relaxation chimique par saut de température. La variation des paramètres "temps" et "amplitude" permet de confondre la courbe simulée et la courbe projetée.

Dans la construction du simulateur, nous nous sommes limités à des courbes à deux temps de relaxation. La figure II,11 donne le schéma électrique de ce simulateur. Un multivibrateur délivre des impulsions carrées qui déclenchent le balayage de l'oscilloscope et qui sont utilisées pour générer les signaux simulés. Ces impulsions passent d'abord dans un circuit RC à résistance variable, permettant de simuler le temps de chauffe. La valeur de ce dernier, qu'on affiche sur le simulateur, est déterminée expérimentalement par la mesure de la résistance de la solution R_c (mesurée à l'aide d'un conductimètre Tacussel CD6N) et par le choix du condensateur haute tension. Chaque impulsion entre ensuite dans un amplificateur opérationnel, puis dans deux voies parallèles où des circuits RC permettent de générer respectivement les temps de relaxation T_1 et T_2. A ce niveau, une commutation permet de choisir entre deux modes d'exploitation (N et Σ):

- Dans le mode N, les signaux des deux voies sont amplifiés pour obtenir les amplitudes respectives A_1 et A_2, puis on fait leur somme algébrique. Les 4 paramètres ajustables sont donc T_1, A_1, T_2 et A_2.

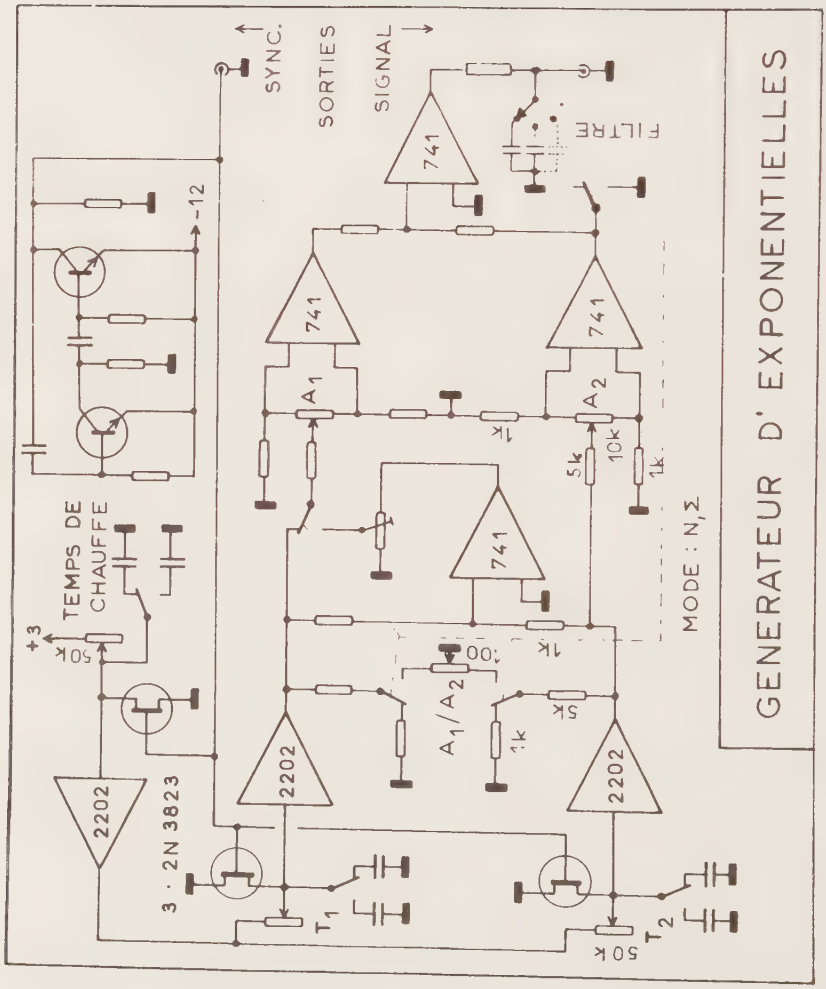


Figure II,11 : Schéma électrique du simulateur de courbes de saut de température à deux temps de relaxation.

- Dans le mode Σ, on ajoute les signaux des deux voies après avoir fixé un rapport A_1/A_2 entre leurs amplitudes, et on amplifie ce signal à une valeur donnée. Les 4 paramètres ajustables sont alors T_1, T_2, $A_1 + A_2$ et A_1/A_2.

Enfin, avant d'attaquer l'oscilloscope, le signal passe dans un filtre RC identique au filtre RC d'amortissement utilisé dans l'expérience de saut de température.

L'utilisation de ce simulateur présente de nombreux avantages :

- rapidité de l'exploitation
- coût beaucoup moins élevé par l'utilisation de films 24 x 36 mm à la place des films Polaroïd.
- simulation de tous les écarts du signal de relaxation chimique par rapport à sa valeur théorique, d'où possibilité, en particulier, d'exploiter facilement des temps de relaxation courts par simulation du temps de chauffe.
- possibilité de déceler les irrégularités de certaines courbes (par comparaison de plusieurs d'entre elles enregistrées dans des conditions identiques), ce qui permet de les éliminer.
- possibilité d'évaluer rapidement la marge d'erreur imputable à chaque temps de relaxation.

L'inconvénient majeur de cette méthode est la nécessité de regrouper les exploitations de nombreuses courbes photographiées sur un film (20 ou 36 poses), "l'étape limitante" étant ici le développement du film.

Ce moyen d'exploitation a été utilisé systématiquement lors de l'étude des variations des temps de relaxation avec la concentration et la température.

3) Autres possibilités d'exploitation envisagées :

Les exploitations manuelles ou par simulateur ont un défaut lié à l'opérateur, à savoir son manque d'objectivité, qui peut parfois donner lieu à un lissage erroné des courbes. Nous envisageons donc de déterminer les paramètres des courbes au moyen d'un ordinateur. Cette méthode permettrait une automatisation complète de l'exploitation. Elle nécessiterait le remplacement de l'oscilloscope à mémoire par un enregistreur rapide de transitoires (convertisseur analogique-numérique) ; ce nouveau dispositif permettrait en outre une accumulation de données (au moyen d'un "accumulateur", ou par l'ordinateur directement), et ainsi une augmentation du rapport signal sur bruit pour l'exploitation des relaxations de très faible amplitude.

Nous avons pu constater dans ce chapitre consacré à la technologie de l'appareil de saut de température que, si le principe de sa construction était simple, de nombreuses difficultés "de détail" ont dû être résolues lors de sa réalisation. Loin d'avoir acquis une forme définitive, nous continuons à étendre ses possibilités, et à accroître ses performances et sa maniabilité en utilisant les nouveautés technologiques qui ne cessent d'apparaître ; le spectrophotomètre rapide qui lui est associé peut même servir à d'autres expériences que celles du saut de température — par exemple, à des expériences d'orientation de macromolécules sous champ électrique (voir chapitre IV) — . Son utilisation exige néanmoins une bonne connaissance de tous les éléments qui le constituent et de toutes ses particularités ; c'est pourquoi nous avons cru bon de nous arrêter un peu sur l'aspect "pratique" de cette utilisation afin que ce chapitre puisse servir de guide à d'autres chercheurs.
A présent, nous allons exposer les résultats que nous avons obtenus avec la technique de saut de température dans l'étude des interactions du DNA avec deux colorants : la tilorone et l'hydroxystilbamidine.

CHAPITRE III

INTERACTION DE LA TILORONE AVEC LES ACIDES NUCLEIQUES

La 2,7-bis(2-(diéthylamino)éthoxy)-fluorène-9-one ou tilorone est un composé ayant une activité antivirale prononcée[31] ainsi qu'une action antitumorale[32-34]. En 1970, KRUEGER et MAYER[35,36] ont indiqué pour la première fois la possibilité d'induire la synthèse d'interféron chez la souris par l'injection de tilorone. Mais la toxicité du produit ne permet guère de l'employer dans les cultures de cellules, comme des lymphocytes[37] par exemple. Son large spectre d'action et le fait que plusieurs dérivés diamines caractérisés par des distances très différentes entre les deux groupes amines sont également actifs, ont laissé supposer que la tilorone est un inducteur non spécifique[38].

CHANDRA et coll.[39] ont relaté l'inhibition de l'action de la DNA-polymérase avec le RNA de virus oncogène par ce colorant. Cette inhibition s'est avéré dépendre de façon sélective du type d'initiateur utilisé dans la réaction enzymatique. D'autre part, l'induction de la synthèse d'interféron peut se produire par la perturbation de la régulation de la synthèse protéique dans lequel le DNA tient une place de choix. Il est donc intéressant d'étudier l'interaction de la tilorone avec le DNA, et sa conséquence sur le rôle de matrice du DNA dans les systèmes mis en cause.

CHANDRA et coll.[40,41] ont encore montré que la tilorone forme un complexe avec le DNA. Leur étude suggère que ce colorant s'intercale dans le DNA, et que sa fixation se fait préférentiellement dans les régions riches en paires A-T. Il apparaît dès lors comme faisant partie de la classe des composés qui possèdent une série de propriétés biologiques en interagissant avec le DNA (colorants acridiques, hydrocarbures polycycliques, antibiotiques comme l'actinomycine, etc...)

DAUNE et coll. ont repris l'étude de l'interaction tilorone-DNA de manière exhaustive, et nous nous y sommes associés en particulier pour la partie cinétique. La nécessité de connaître un certain nombre de paramètres thermodynamiques pour pouvoir exploiter les résultats cinétiques et pour proposer un modèle d'interaction nous a amené à approfondir l'étude de la stoechiométrie de la fixation sur le DNA et sur différents polynucléotides. Une fructueuse collaboration entre les deux laboratoires a ainsi pris forme et s'est poursuivie avec d'autres études actuellement en cours.

III. 1. Matériel et Méthodes.

A. Produits chimiques utilisés :

1) La tilorone était un don des établissements MERRELL et Toraude à Monsieur le Professeur Ebel. Elle était sous forme d'hydrochlorure et a été utilisée sans nouvelle purification. Nous en avons constitué une solution stock de concentration $4.10^{-3}M$ qui a été conservée à l'abri de la lumière à la température ordinaire.

2) Le DNA de thymus de veau a été isolé par l'équipe du Professeur DAUNE suivant la méthode des détergents[41]. Pour les expériences de stoechiométrie, nous l'avons purifié une nouvelle fois par une série de dialyses contre de l'EDTA $10^{-3}M$ dans une solution 0,1*M* NaCl, puis contre 0,1*M* NaCl, enfin contre 0,1*M* NaCl + 0,002 *M* tampon phosphate, pH = 7.
Le DNA utilisé lors des expériences de saut de température a été préalablement dégradé par l'action des ultrasons selon la méthode décrite par LITZLER[42].
La détermination des concentrations a été faite spectroscopiquement en utilisant un $\varepsilon(P)_{260} = 6.600$.

3) Les polynucléotides de synthèse poly[d(A-T)], poly(dG)-poly(dC) et poly(rA) sont des produits commerciaux MILES ou P.L. BIOCHEMICALS. Ils ont été, comme le DNA, purifiés pour les expériences de stoechiométrie. Les concentrations ont été mesurées spectroscopiquement en utilisant les valeurs $\varepsilon(P)_{262} = 5.700$ pour le poly [d(A-T)] et $\varepsilon(P)_{253} = 7.400$ pour le poly(dG)-poly(dC).

B. Appareillage :

Outre l'appareil de saut de température, nous avons essentiellement utilisé :

- un spectrophotomètre enregistreur Cary 14 pour les expériences courantes de spectrophotométrie.
- un spectrophotomètre enregistreur Cary 118 C pour les expériences exigeant une grande sensibilité (densités optiques très faibles ou très fortes)
- une ultracentrifugeuse Beckman Spinco modèle L2 munie d'un rotor 40-3
- un désintégrateur ultrasonore M.S.E. 500W
- un appareil de saut de pression et un appareil à perturbation par ondes de choc. Nous remercions ici le CNRS et la Deutsche Forschungsgemeinschaft de nous avoir permis, lors d'un voyage à Erlangen, de travailler sur ces deux appareils
- une calculatrice Hewlett-Packard HP 9100 B pour l'exploitation des résultats.

C. Méthodes :

Ce paragraphe est consacré à la description des techniques physicochimiques autres que les méthodes de relaxation déjà traitées dans les chapitres précédents.

1) Mesures spectrophotométriques : La comparaison des spectres d'absorption du colorant fixé à différents polynucléotides porte sur des spectres "limites", c'est-à-dire correspondant à des solutions où le rapport polymère sur colorant (P/D) est suffisamment élevé pour que la quasi-totalité de ce dernier soit fixée.

L'étude spectrophotométrique du colorant complexé implique évidemment l'emploi de solutions de référence correspondantes de polymère. Les mesures ont été effectuées sur des solutions concentrées en polynucléotide et de faible teneur en tilorone ($D.O._{270} = 0,1$). Dans le cas du complexe tilorone-poly(dG)-poly(dC), l'étude stoechiométrique indique la présence de colorant libre en concentration non négligeable. Mais la connaissance de la quantité de tilorone libre nous a permis de soustraire son spectre au spectre global.

2) Méthodes d'études stoechiométriques : Pour étudier la stoechiométrie du complexe et déterminer les paramètres régissant l'association tilorone-DNA (ou d'autres polynucléotides), trois méthodes ont été utilisées conjointement :

- une technique spectroscopique pour le DNA, le poly(dG)-poly(dC) et le poly [d(A-T)]
- la sédimentation intégrale du complexe par ultracentrifugation pour le DNA
- la microdialyse pour le DNA, le poly(dG)-poly(dC) et le poly [d(A-T)].

a) Spectroscopie : Cette étude a été effectuée en même temps que la détermination du spectre d'absorption du colorant complexé : les deux cuves de parcours optique 0,1 cm contiennent initialement une solution concentrée de polynucléotide (D.O. 10 à 20 pour 1 cm de parcours optique). Dans la cuve de mesure, nous ajoutons avec une microseringue des quantités croissantes de solution de tilorone et de sel de fond pour maintenir une force ionique constante et dans la cuve de référence,

des quantités équivalentes de sel de fond. Nous obtenons ainsi différentes valeurs du coefficient d'extinction moyen ε_M à 270 nm correspondant à la moyenne pondérée des coefficients ε_c du colorant complexé et ε_ℓ du colorant libre. La variation de ε_M en fonction de la quantité totale de tilorone ajoutée donne une courbe sigmoïdale dont la superposition à une courbe théorique permet de déterminer le coefficient ε_c (dans le cas d'une seule série de sites indépendants), la (les) constante(s) d'équilibre et le (les) nombre(s) de sites par nucléotide. Dans le cas de l'existence de plusieurs sites, il est nécessaire, pour l'exploitation des résultats, d'avoir des renseignements sur les $\varepsilon_{c,i}$ par d'autres méthodes ou de supposer que les $\varepsilon_{c,i}$ des sites faibles sont égaux à celui du site fort.

b) Sédimentation complète du complexe par ultracentrifugation :

Si l'on soumet une solution contenant le complexe tilorone - DNA à un champ de gravitation élevé, on peut séparer le complexe macromoléculaire. En effet, d'après l'équation de Scatchard, le taux de fixation r et la concentration de colorant libre $\overline{C}_D$ sont indépendants de la concentration en nucléotide P (voir § III,3) ; à chaque instant, la frontière de sédimentation équivaut à une membrane de dialyse. Comme nous opérons en force ionique $\mu = 0,1$, les erreurs dues à l'équilibre de Donnan sont négligeables.

Une série de solutions correspondant à des valeurs croissantes de r ont été soumises à une ultracentrifugation à 35.000 tours/mn pendant 15 heures. La teneur en tilorone libre dans la phase surnageante a été déterminée par spectrophotométrie d'absorption

à 270 nm. Deux essais témoins ont permis de vérifier que

1) l'adsorption du colorant sur les parois du tube était négligeable

2) le DNA avait sédimenté en totalité.

La concentration de DNA utilisée lors de ces expériences a été de 7,5 10^{-4}M (exprimée en nucléotide).

Cette méthode est précise et rapide ; c'est pourquoi nous l'avons utilisée dans la détermination de l'isotherme de fixation pour le complexe tilorone-DNA (une partie des résultats provient d'une expérience préliminaire réalisée par L.SCHREIBER). Elle n'a pas pu être utilisée dans les études de l'interaction de la tilorone avec le poly [d(A-T)] et le poly(dG)-poly(dC) à cause des trop grandes quantités de polynucléotide requises. Nous avons donc été amené à mettre au point une technique de microdialyse d'après les plans rapportés par TONDRE de son séjour aux U.S.A., au laboratoire du Professeur HAMMES.

c) Microdialyse : La dialyse consiste à laisser diffuser le colorant libre au travers d'une membrane imperméable à la macromolécule jusqu'à atteindre un équilibre thermodynamique de concentration entre colorant libre et fixé. En microdialyse, le sac à dialyse qui contient généralement la solution de polymère est remplacé par une portion de membrane qui sépare deux compartiments cylindriques de faible volume (180 µl) creusés dans deux plaques en plexiglass. Pour réaliser simultanément 16 dialyses, nous avons fait usiner cinq plaques carrées en plexiglass comportant quatre cavités cylindriques de 11 mm de diamètre et de 1,9 mm de profondeur sur chacune de leurs deux bases (figure III,1). Les cinq plaques sont serrées les unes contre les autres au moyen de cinq tiges filetées les traversant de part en part et d'écrous.

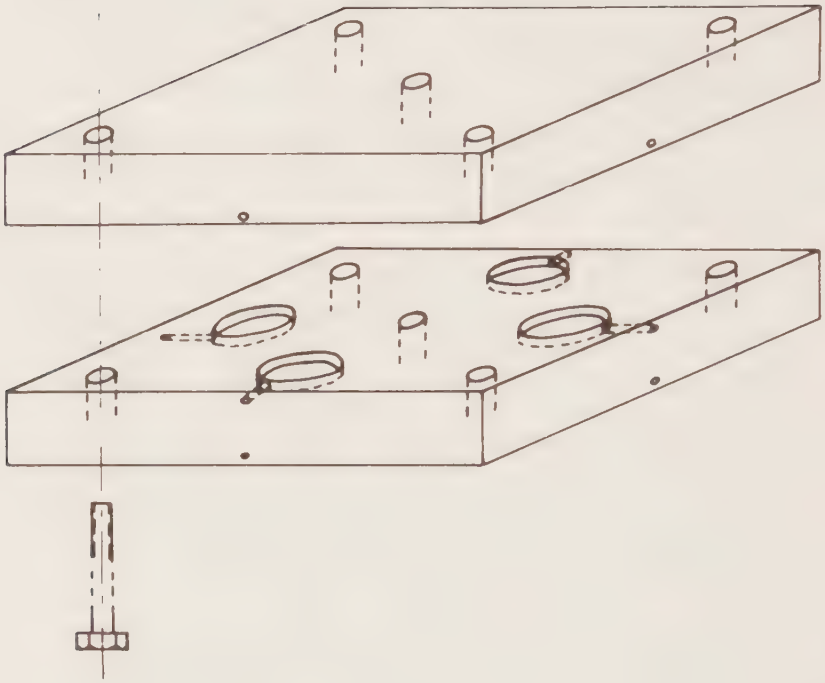


Figure III,1 : Plaques de microdialyse.

Le remplissage et la vidange des cavités cylindriques se fait à l'aide d'une microseringue, par d'étroits canaux latéraux. Des bulles résiduelles réalisent l'agitation des solutions dans les compartiments lorsqu'on procéde à la rotation du bloc monté.

Cependant cette méthode présente des inconvénients :

- sa mise en oeuvre est très longue, à cause des nombreux nettoyages et des nombreux intermédiaires qu'elle nécessite.
- l'équilibre est lent à s'établir (24 heures).

- l'adsorption éventuelle du colorant sur la membrane de dialyse et sur les parois en plexiglass oblige à déterminer non seulement la fraction de colorant dans le compartiment "colorant", mais également à doser la concentration totale de tilorone ($rP + \overline{C}_D$) dans le compartiment "polynucléotide".

En pratique, nous avons opéré comme suit :
Les membranes de dialyse (Visking) ont été soumises à 6 ébullitions de 20 mn dans des solutions de $NaHCO_3$, suivies d'un traitement à l'EDTA, d'un rinçage abondant et d'une ébullition dans l'eau distillée, afin d'éliminer toute trace de relargage parasite. Elles ont été conservées à 5°C dans l'alcool absolu. Avant leur emploi, les "carrés" découpés ont été réhydratés et stabilisés par immersion durant 24 heures dans une solution tampon de force ionique correspondant à l'expérience (0,1 *M* NaCl + 0,002 *M* tampon phosphate, pH = 7). Le montage des plaques et des membranes (séchées rapidement sur un papier filtre) a été effectué avec des gants en latex pour éviter toute possibilité de contamination (ions, matières organiques, etc.).

Quatre essais témoins ont été réalisés pour chaque série de mesures :

1) sel de fond contre sel de fond
2) sel de fond contre polynucléotide (2x)
3) colorant contre sel de fond.

Ils ont permis d'évaluer la qualité des membranes et des polymères et de contrôler la concentration de macromolécules. Chaque dialyse a été effectuée avec 150 µl d'une solution de tilorone de concentration connue et 150 µl d'une solution de polynucléotide de densité optique déterminée, introduite à l'aide d'une microseringue

dans leurs compartiments respectifs. L'ensemble a été mis en rotation durant 24 heures (10 tours/mn) dans une pièce thermostatée à 20°C. Les différentes phases ont été prélevées avec des pipettes Pasteur, diluées à 430 µl au moyen de λ-pipettes (130 µl + 300 µl) et dosées spectrophotométriquement.

Pour les compartiments "colorant", le spectre de chaque échantillon a été enregistré. Des traces de matière diffusante (solution légèrement laiteuse) ont rendu l'exploitation délicate ; les essais-témoins ont montré que l'influence de ces impuretés sur les spectres équivalait à prendre une droite oblique comme ligne de base dans le domaine de longueurs d'onde considéré ; nous avons donc calculé, pour chaque dosage et par une méthode itérative, la position de cette droite de façon que les rapports des ordonnées à 320 nm, 270 nm et 250 nm correspondent à ceux d'un spectre de tilorone. La concentration totale de tilorone dans le compartiment"polymère" a été déterminée à partir de la densité optique mesurée à 270 nm et d'une courbe d'étalonnage établie en ajoutant des concentrations connues de tilorone à une solution de polynucléotide identique et diluée dans les mêmes conditions. Cette façon de procéder nous a permis de tracer une courbe $\Delta C_T = f(C_T^\circ)$, $-C_T^\circ$ étant la concentration totale de tilorone introduite dans le compartiment "colorant" – permettant d'apprécier les phénomènes d'adsorption . Dans le calcul de la fraction liée au polymère, nous avons finalement utilisé une quantité totale de colorant en solution égale à $(C_T^\circ - \Delta C_T - \overline{C}_D)$.

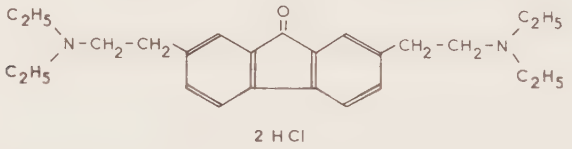
Remarque : Des résultats reproductibles et cohérents n'ont été obtenus qu'à partir du moment où :

1) nous avons réussi à maîtriser parfaitement le nettoyages des micro-seringues (dont la paroi intérieure est en verre dépoli).
2) nous avons purifié au préalable les polynucléotides par dialyse.

III. 2. La tilorone et son association avec les acides nucléiques.

A. Caractères de la molécule de tilorone :

En milieu acide, la tilorone (III,2,1) porte deux charges positives localisées sur les groupes ammoniums substitués qui favorisent vraisemblablement sa fixation au niveau des groupes phosphates du DNA



(III,2,1)

La courbe de neutralisation de la tilorone indique que les deux groupes ammoniums sont équivalents et que leur pK_A est égal à 8,6. La tilorone neutre est très peu soluble dans l'eau et il apparaît un précipité laiteux orangé au delà de pH = 8,5. Cela nous a conduit à adopter un pH de travail égal à 7 ; nous avons ainsi la certitude, d'une part d'avoir un DNA sous forme native où les bases sont dans leur état naturel de protonation, et d'autre part de n'avoir pratiquement que du colorant ionisé en solution.

La tilorone absorbe fortement dans l'ultraviolet et faiblement dans le visible.(Figure III,2). Son spectre dans l'ultraviolet est caractérisé par un pic très étroit et très intense situé vers 270 nm (coefficient d'extinction : $\varepsilon_{270} = 78.000$) et par deux épaulements vers 260 nm et 310 nm. Dans le visible, on observe un petit pic d'absorption dont le maximum se situe à 470 nm et dont le coefficient d'extinction est $\varepsilon_{470} = 250$. Ce pic d'absorption est à l'origine de la couleur orange des solutions concentrées et de la poudre de tilorone.

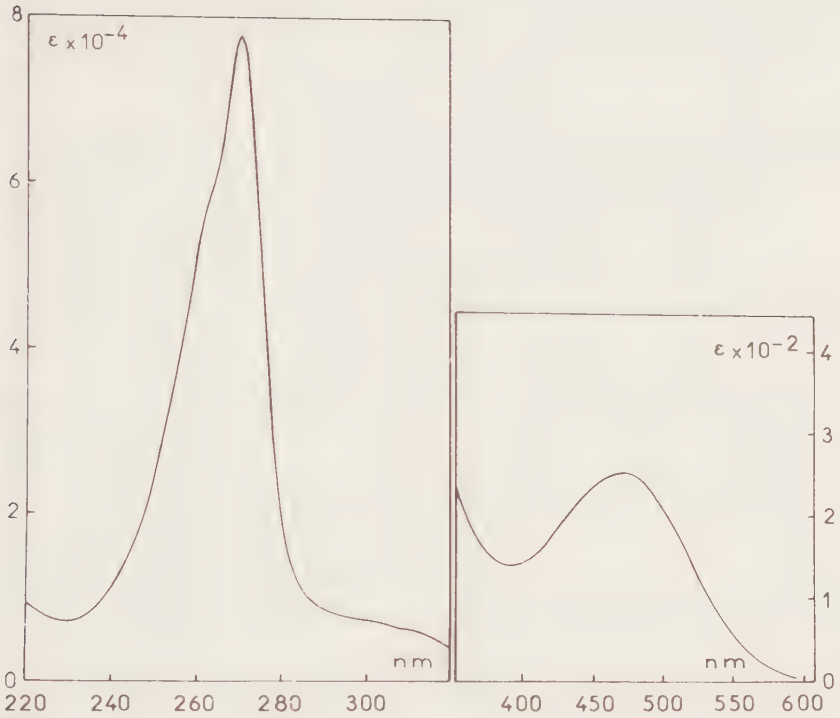


Figure III,2 : Spectre d'absorption de la tilorone en solution aqueuse (pH = 7)

Le spectre différentiel thermique de la tilorone a été obtenu au moyen de l'appareil de saut de température (figure III,3) : une série de sauts de 3,3°C ont été effectués à diverses longueurs d'onde sur une solution de colorant de concentration $3,2.10^{-5}M$ en milieu NaCl 0,1*M*, tampon phosphate pH = 7. Nous avons relevé, pour chaque longueur d'onde, l'amplitude totale du signal de relaxation. Ce signal varie avec une constante de temps égale au temps de chauffe de l'appareil.

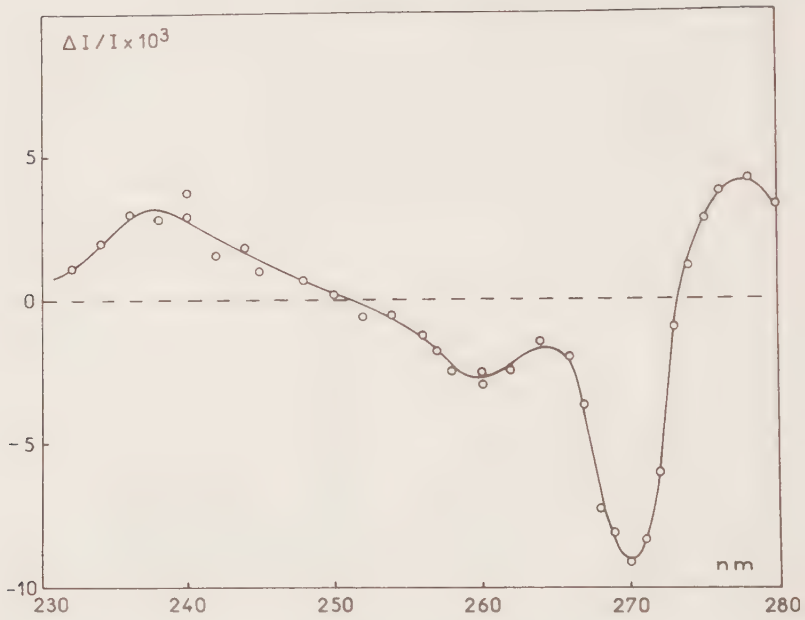


Figure III,3 : Spectre différentiel thermique de la tilorone obtenu à l'aide de l'appareil de saut de température. Concentration de tilorone : 3,2.10^{-5}M ; force ionique : μ = 0,1 ; pH = 7. Température initiale : 17,7°C ; température finale : 21°C.

Nous retrouvons sur ce spectre différentiel thermique les caractéristiques du spectre d'absorption qui vont nous intéresser plus loin, à savoir les deux transitions à 270 nm et à 260 nm. Le fait qu'il existe un tel spectre différentiel pour le colorant seul en force ionique 0,1 nous incite surtout à penser que les molécules de colorant interagissent entre elles de manière à donner lieu à une variation du coefficient d'extinction. Si la formation de dimères en solution pure diluée est très limitée, la tendance à l'empilement sur une chaîne polyanionique peut être

très marquée, et nous devrons tenir compte de cette possibilité d'interaction dans nos investigations avec des polynucléotides.

B. Caractères de la tilorone complexée au DNA et aux polynucléotides

La fixation de la tilorone sur le DNA est mise en évidence :

- par la stabilisation thermique du DNA[39]
- par la modification des caractères spectroscopiques du colorant
- par la précipitation du complexe à forte concentration de colorant
- par un important changement de structure du polynucléotide décelé par dichroïsme circulaire.

La tilorone s'intercale entre les paires de bases du DNA comme la plupart des aminoacridines en provoquant un allongement de la chaîne de DNA mesurable par viscosité[40] ou par sédimentation[40].

Toutes ces variations dépendent de la nature du polymère. Ainsi le signal de dichroïsme circulaire est nul pour le poly(dG)-poly(dC), et augmente avec la proportion de paires A-T (M.DAUNE et L.SCHREIBER).

Les spectres de la tilorone complexée aux différents biopolymères étudiés (figure III,4) ont été déterminés suivant la méthode décrite dans le paragraphe III,1,C. Ils montrent tous une forte hypochromicité du colorant fixé par rapport au colorant libre.

D'autre part, on peut remarquer que les hypochromicités des transitions à 270 nm et à 260 nm ne sont pas les mêmes pour les différents polynucléotides.

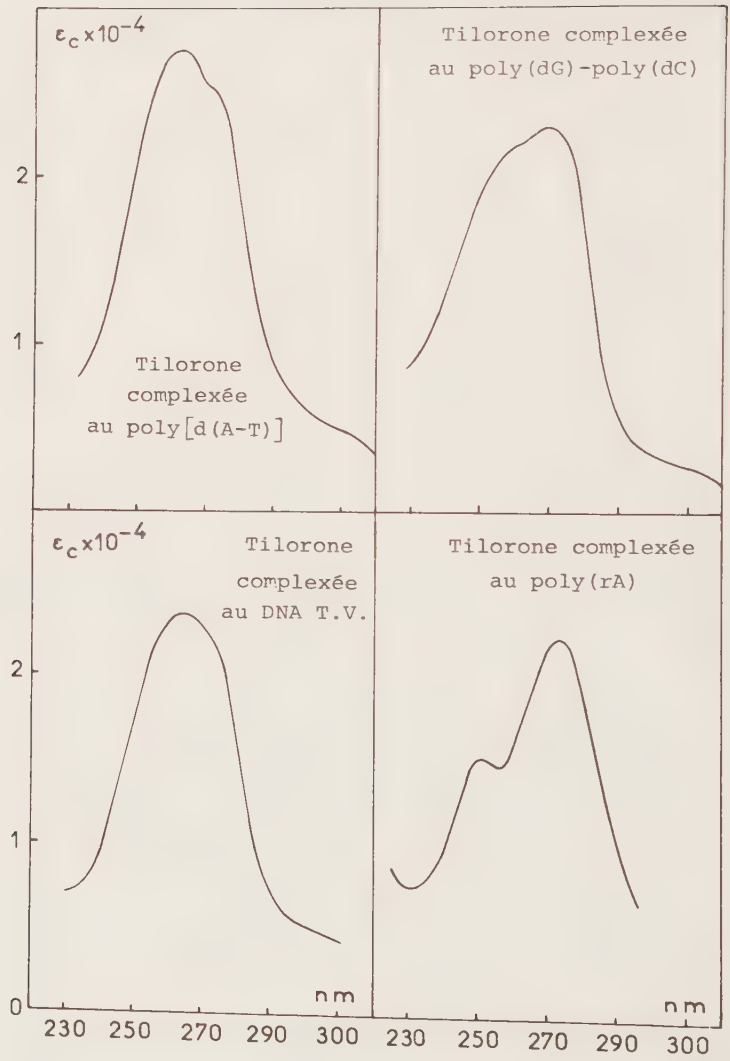


Figure III,4 : *Spectres de la tilorone complexée à divers polymères, obtenus avec un rapport P/D élevé (100 à 200) et une concentration du polynucléotide forte et identique dans les cuves de mesure et de référence (D.O. ≃ 10 à 20).— 10^{-3} M NaCl, pH = 7.*

Le spectre du colorant complexé au DNA de thymus de veau a des caractéristiques intermédiaires entre ceux du colorant complexé au poly [d(AT)] et au poly(dG)-poly(dC). Enfin, le spectre de la tilorone complexée au poly(rA) sous forme neutre démontre l'importance de la structure secondaire dans le mode de fixation, et met à nouveau en évidence la possibilité d'empilement des molécules de tilorone le long des phosphates.

Les coefficients d'extinction ε_c de la tilorone complexée ont été déterminés suivant la méthode décrite plus haut (page 79). Mais, étant donné que les polynucléotides absorbent aux mêmes longueurs d'onde que le colorant, il a été nécessaire de vérifier que le coefficient d'extinction $\varepsilon(P)$ du DNA ne varie pas lors de la fixation : nous avons obtenu la même valeur de ε_c pour deux concentrations très différentes de DNA (D.O. = 10,2 et 21,2), ce qui indique que toute l'hypochromicité est bien imputable au colorant.

La figure III,5 représente la variation de ε_M (défini page 80) en fonction de la concentration totale de tilorone pour trois polynucléotides en solution $10^{-3}M$ NaCl.

Les résultats en force ionique $10^{-1}M$ NaCl sont donnés plus loin (figure III,9 à III,12).

Le tableau III,1 rassemble les valeurs de ε_c obtenues avec les

μ	poly[d(A-T)]	DNA T.V.	poly(dG)-poly(dC)	poly(rA)
10^{-3}	25.500	23.500	23.500	22.000
10^{-1}	26.000	23.000	23.500	

Tableau III,1.

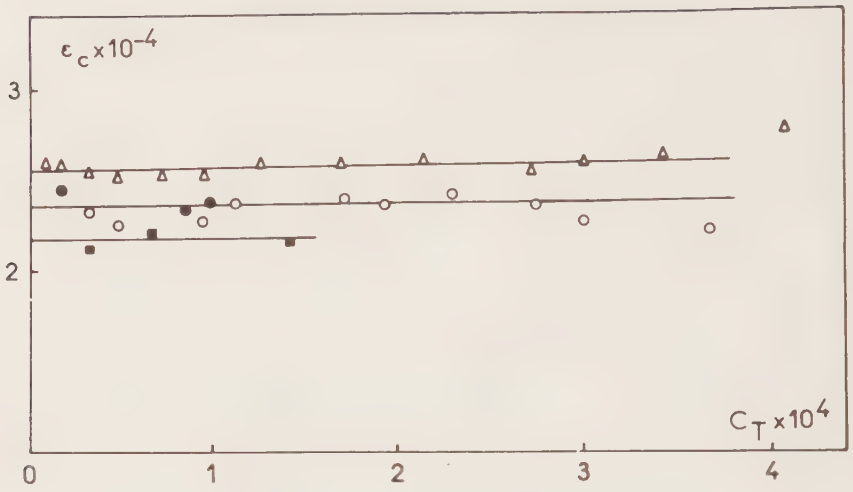


Figure III,5 : Détermination du coefficient d'extinction de la tilorone complexée à divers polymères, en 10^{-3}M NaCl :
poly[d(A-T)] D.O. = 15,5 (Δ)
DNA T.V.474 D.O. = 21,2 (○) et D.O. = 10,2 (●)
poly(rA) D.O. = 15 (■)

différents polymères étudiés, pour deux forces ioniques. On constate que les coefficients d'extinction sont voisins malgré la différence que présentent les spectres.

III. 3. Etude stoechiométrique de l'association tilorone-DNA et polynucléotides.

Dans le paragraphe précédent, nous avons mis l'accent sur l'importance de la composition en bases des polynucléotides dans leur association avec la tilorone. Une diversité de comportement aussi grande doit nécessairement se répercuter sur les paramètres stoechiométriques rendant compte de la fixation sur des chaînes macromoléculaires aussi différentes que le poly(dG)-poly(dC), le poly[d(A-T)] et les DNA. C'est ce que nous allons voir à présent en examinant les résultats de l'étude stoechiométrique des systèmes tilorone - DNA et polynucléotides.

A. Rappels théoriques concernant la fixation sur une macromolécule:

1) Considérons le cas où les molécules D se fixent à la macromolécule P sur des sites indépendants et équivalents. La fixation est alors caractérisée par l'équation de Scatchard[43]:

$$\frac{r}{\bar{C}_D} = K\,(n-r) \qquad \text{(III,3,1)}$$

où r *est le nombre de molécules* D *fixées par monomère*
$\bar{C}_D$ *la concentration de molécules* D *libres,*
K *la constante d'association*
et n *le nombre de sites indépendants par monomère.*

La représentation de $r/\bar{C}_D$ en fonction de r est alors une droite de pente -K, d'ordonnée à l'origine Kn, dont le point d'intersection avec l'abcisse est n. Cette représentation est appelée "*isotherme de Scatchard*".

Souvent la représentation de $r/\bar{C}_D$ en fonction de r n'est pas une droite. On peut alors envisager les cas suivants :

2) S'il y a interaction entre molécules fixées sur des sites voisins, la loi de variation est la suivante :

$$\frac{r}{\bar{C}_D} = K(n-r)e^{-wr}$$

où w caractérise l'interaction : lorsque w<o, l'interaction est de de type coopératif et lorsque w>o, l'interaction est de type répulsif.

3) Il y a une limitation topologique à la fixation : au-dessus d'une valeur de r suffisamment élevée, la probabilité du peuplement des sites décroît progressivement de sorte que tout se passe comme si les sites n'étaient plus équivalents. On parle alors de modèle à exclusion de sites[44].

4) Si on considère l'existence de plusieurs séries de sites homogènes caractérisés par les paramètres K_i, n_i et w_i, des équations plus générales peuvent être proposées :

a) $w_i = 0$:

$$\frac{r}{\bar{C}_D} = \sum_i \frac{K_i n_i}{1 + K_i \bar{C}_D} \qquad \text{(III,3,2)}$$

b) $w_i \neq 0$:

$$\frac{r}{\bar{C}_D} = \sum_i \frac{K_i n_i e^{-w_i r}}{1 + K_i \bar{C}_D e^{-w_i r}}$$

Pour les cas 2/ à 4/, différents modes de représentation des résultats expérimentaux permettent de déterminer les paramètres stoechiométriques et thermodynamiques. On peut également conserver une représentation unique (celle de l'isotherme de Scatchard); on essaye alors de trouver le meilleur accord entre les points expérimentaux et une courbe correspondant à une expression théorique dans laquelle on fait varier les différents paramètres. C'est cette dernière méthode que nous avons utilisée ; nous avons testé tous les cas énumérés pour retenir le plus simple qui rende bien compte des résultats.

B. Principaux résultats.

La plupart des expériences de fixation ont été réalisées dans les conditions standard requises pour une étude cinétique valable :

0,1 *M* NaCl

0,002 *M* tampon phosphate pH = 7

20°C

1) Ultracentrifugation et microdialyse ·

Les figures III,6 à III,8 regroupent les résultats obtenus pour le DNA, le poly[d(A-T)] et le poly(dG)-poly(dC).
On peut remarquer que, si les isothermes de Scatchard sont linéaires avec le poly [d(A-T)] et le poly(dG)-poly(dC), il est difficile de conclure pour le DNA, car la dispersion des points à r faible est grande. La fixation est plus forte avec le poly[d(A-T)] qu'avec le poly(dG)-poly(dC), mais le nombre total de sites est presque identique pour ces deux polynucléotides.

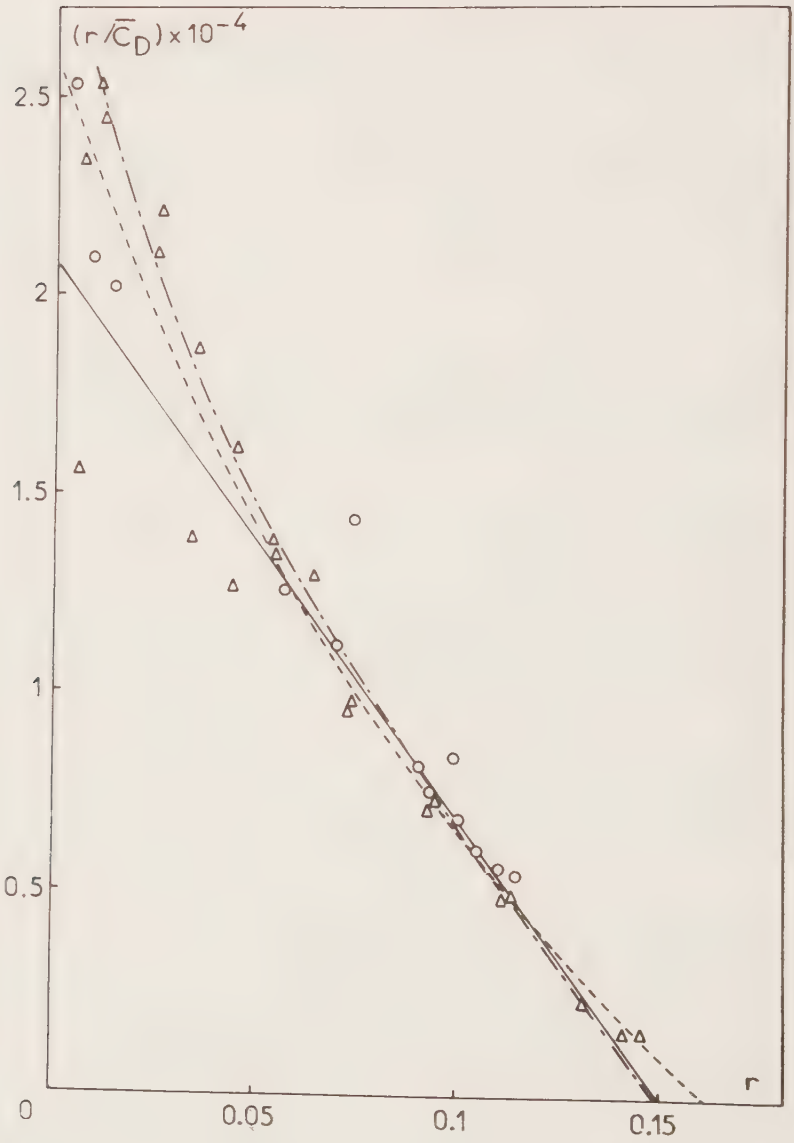


Figure III,6 : Association tilorone-DNA T.V. 526 : μ = 0,1 ; pH = 7 ; 20°C ; microdialyse (Δ) et ultracentrifugation (o) ; DNA purifié par dialyses préalables.

——— *K = 136.000 ; n = 0,15*

– – – – *K_1 = 440.000, n_1 = 0,035 ; K_2 = 85.000, n_2 = 0,125*

——— – – *K = 1,6 10^6 ; n = 0,0005*

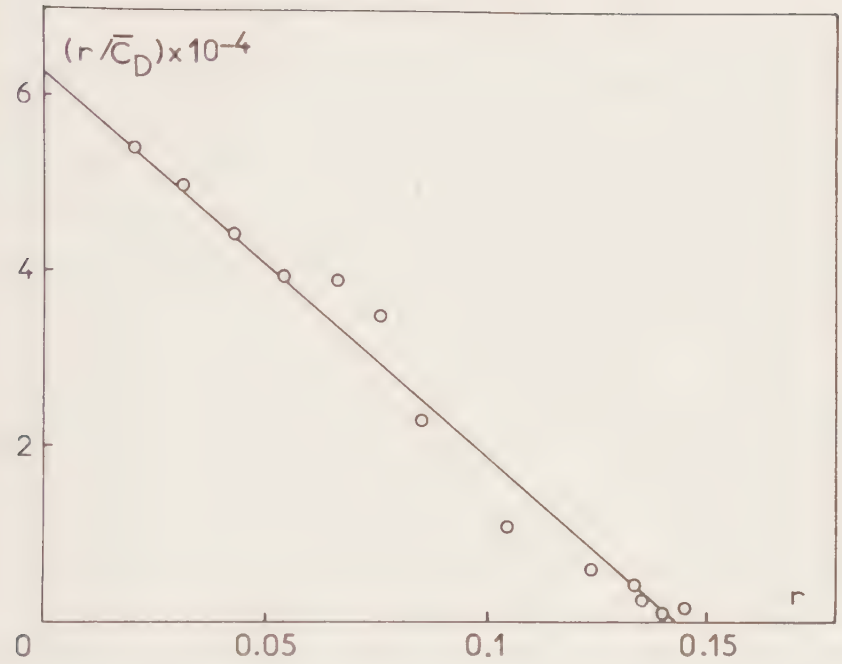


Figure III,7 : Association tilorone-poly[d(A-T)] : μ = 0,1 ; pH = 7, 20°C ; microdialyse ; poly[d(A-T)] purifié par dialyses préalables. K = 440.000, n = 0,143.

Nous avons, dans les conditions énumérées ci-dessus :

	K	n
poly[d(A-T)]	440.000	0,142
poly(dG)-poly(dC)	80.000	0,13

Les mesures a r élevé pour le poly(dG)-poly(dC) exigent une forte concentration de tilorone ; dans ce cas, il n'est pas exclu que l'écart des points par rapport à la portion droite de l'isotherme de la figure III,8 pour r>0,13 soit dû à un phénomène d'empilement des molécules de tilorone le long des phosphates. Il est peut-être simplement imputable à l'erreur expérimentale dans cette région.

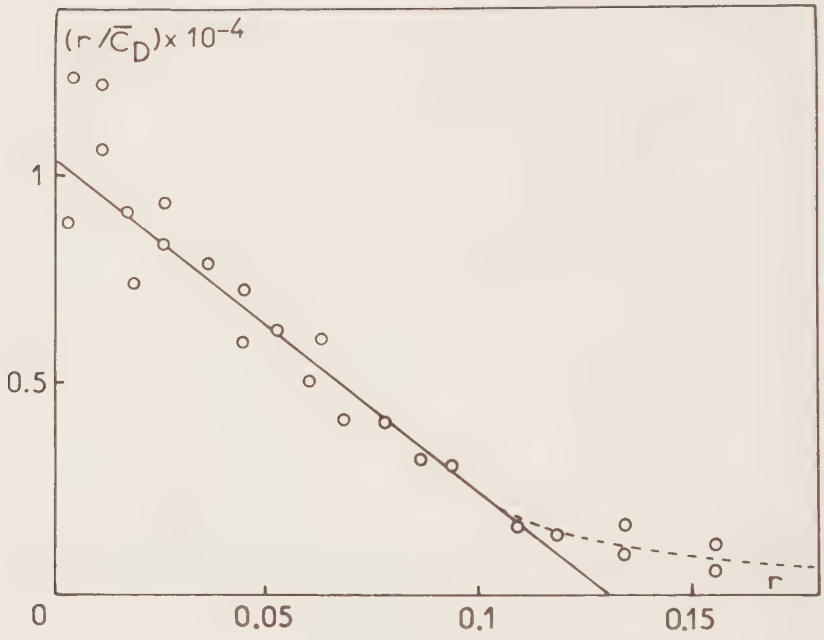


Figure III,8 : Association tilorone-poly(dG)-poly(dC) : μ = 0,1 ; pH = 7, 20° C ; microdialyse ; poly(dG)-poly(dC) purifié par dialyses préalables.

Il peut enfin dénoter la présence d'un deuxième site de très faible affinité (K=500) et non spécifique (n = 0,5 - 0,13) correspondant à la fixation électrostatique d'une tilorone par plateau de base au moyen d'une seule charge[45].

Dans le cas du DNA, seule la détermination du nombre de sites est précise : n = 0,15 (μ = 0,1).

D'autres expériences effectuées en faible force ionique avec d'autres techniques (dichroïsme circulaire, viscosité, spectroscopie) ont toutes donné des valeurs de n comprises entre 0,16

et 0,17 pour les trois polynucléotides étudiés. La force ionique tend donc à faire diminuer légèrement le nombre de sites qui est fondamentalement de 1/6 par nucléotide, soit un site pour trois plateaux de bases.

L'imprécision des résultats relatifs à la fixation de la tilorone sur le DNA (figure III,6) nous amène à envisager les possibilités suivantes :

a) *L'isotherme est une droite* : la constante d'association est alors égale à 135.000. Dans ce cas, l'association de la tilorone au DNA serait tributaire de l'état dynamique de l'édifice bicaténaire et se ferait sans distinction entre les paires A-T et les paires G-C. Il est logique de penser que cet état dynamique est lui-même lié à la proportion de paires A-T, ce qui expliquerait la variation de la constante d'association de 80.000 pour le poly(dG)-poly(dC) à 400.000 pour le poly[d(A-T)] en passant par 135.000 pour le DNA de thymus de veau (58 % de paires A-T).

b) *L'isotherme n'est pas une droite* : en effet, la majorité des points expérimentaux pour $r<0,05$ se trouvent au-dessus de la droite considérée précédemment. En choisissant alors un modèle à 2 sites indépendants, on peut jouer sur les 4 paramètres K_1, K_2, n_1 et n_2 et chercher un bon accord avec les points expérimentaux. De nombreuses solutions sont possibles, à cause de l'imprécision des résultats pour r faible. On peut néanmoins s'imposer des conditions supplémentaires en faisant certaines hypothèses :

- Le raisonnement *a)* est valable, mais l'isotherme s'écarte de la droite pour r faible : on obtient alors un bon accord en prenant comme valeurs des paramètres :

$K_1 = 1,6\ 10^6 M^{-1}$ $\quad K_2 = 130.000 M^{-1}$

$n_1 = 0,008$ $\quad n_2 = 0,142$

La portion courbe de l'isotherme indiquerait une grande affinité de la tilorone pour un site très spécifique. Or il y a 20 possibilités différentes de séquences de 3 paires de bases. Dans le cas du DNA de thymus de veau, chaque séquence a une fréquence approximative $n = \frac{0,167}{20} = 0,0083$, valeur qui est à comparer avec n_1. Une telle spécificité pourrait être liée au rôle d'inducteur d'interféron de la tilorone.

- Le raisonnement *a)* n'est pas valable : les diverses considérations du paragraphe II,2 (spectres, signaux de dichroïsme qui varient avec la fraction de paires A-T) peuvent également faire penser à une hétérogénéité de sites moins spécifiques que dans le cas considéré précédemment. Dans une première approche du problème, on peut partir des résultats obtenus pour le poly[d(A-T)] et pour le poly(dG)-poly(dC), et supposer qu'il existe deux séries de sites dont l'une correspond à des sites que l'on trouve sur le poly[d(A-T)] ($K_1 = 440.000$), l'autre à des sites dont l'affinité est voisine de ceux du poly(dG)-poly(dC) ($K_2 = 80.000$). En ajoutant à ces considérations la nécessité pour le site 1 d'être formé de 3 paires de bases dont deux consécutives au moins sont A-T et T-A (respectant ainsi la symétrie de la molécule de tilorone), on obtient un nombre n_1 égal à 0,032. Les 4 paramètres ainsi déterminés permettent de tracer une isotherme de Scatchard théorique qui est en bon accord avec les points expérimentaux.

En fait, il est possible que plus de deux sites d'affinité différente soient impliqués dans le phénomène de fixation de la tilorone au DNA. Malheureusement, nous manquons de données pour poursuivre

plus loin notre raisonnement.

Pour choisir entre les différents cas énumérés, il faudrait en particulier avoir une isotherme mieux déterminée, ce qui est très délicat à réaliser avec les techniques utilisées. Une solution élégante serait de pouvoir s'affranchir de l'utilisation de la spectroscopie pour le dosage de la tilorone et d'utiliser de la tilorone marquée au ^{14}C dont la synthèse est décrite par V. GAUR[46].

2) Etude spectroscopique : Les figures III,9 à III,11 donnent des exemples de variation de ε_M en fonction de la quantité de tilorone ajoutée dans la cuve de mesure (C_T). Les résultats obtenus par cette méthode confirment les résultats de l'ultracentrifugation et de la microdialyse ; malheureusement, ils ne

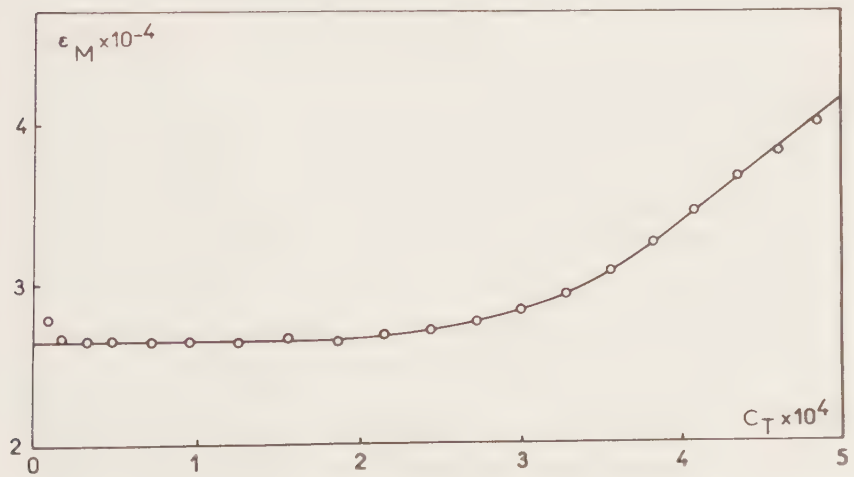


Figure III,9 : Association tilorone - poly[d(A-T)] : Variation de ε_M en fonction de la concentration totale de tilorone ; $\mu = 0,1$; pH = 7, 20°C ; concentration du polymère : $2,9.10^{-3}$M. La courbe théorique correspond à $K_1 = 440.000$, $n_1 = 0,12$; $K_2 = 44.000$, $n_2 = 0,026$.

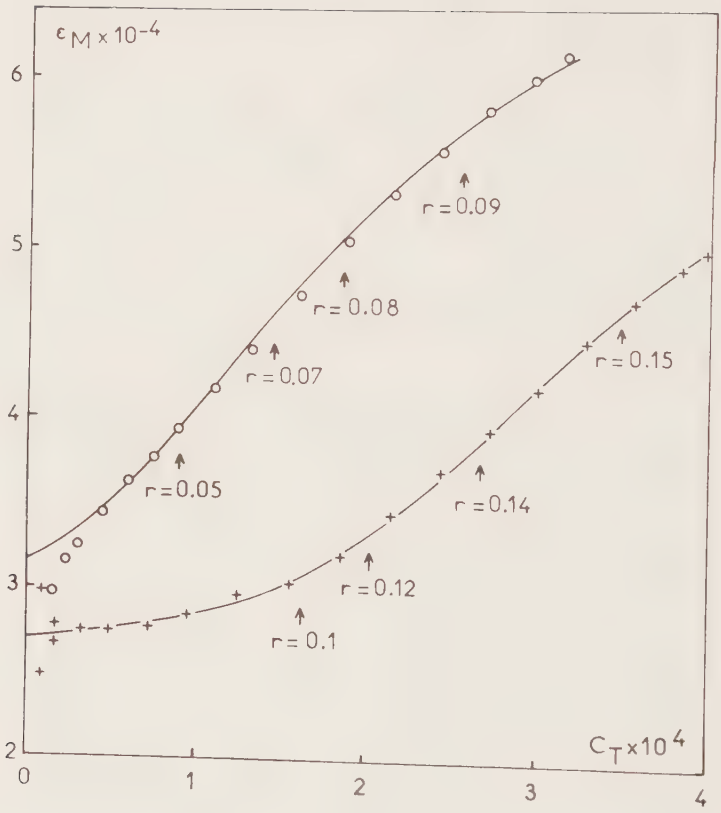


Figure III,10 : Association tilorone - poly(dG)-poly(dC) : Variation de ε_M *en fonction de la concentration totale de tilorone : (o)* $\mu = 0,1$ *; pH = 7, 20°C ; concentration du polymère :* $1,3.10^{-3}$*M. La courbe théorique correspond à K = 80.000, n = 0,09 et* $\varepsilon_c = 24.000$ *(+)* $\mu = 0,001$ *, pH = 7, 20°C ; concentration du polymère :* $1,5.10^{-3}$*M. La courbe théorique correspond à K = 85.000, n = 0,162 et* $\varepsilon_c = 24.300$ *.*

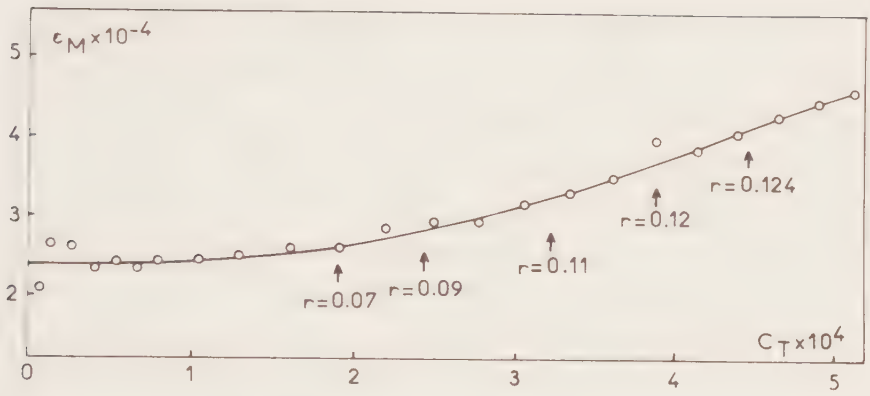


Figure III,11 : Association tilorone – DNA T.V. 474 : Variation de ε_M en fonction de la concentration totale de tilorone : $\mu = 0,1$; pH = 7, 20°C ; concentration du polymère : $2,75.10^{-3}$M. La courbe théorique correspond indifféremment à :

$K_1 = 400.000$, $n_1 = 0,032$
$K_2 = 80.000$, $n_2 = 0,1$
et à: $K_1 = 140.000$, $n_1 = 0,115$
$K_2 = 18.000$, $n_2 = 0,02$

permettent pas de trancher entre les différents cas énumérés plus haut. En effet, il y a accord entre courbe théorique et points expérimentaux pour toutes les combinaisons de valeurs des paramètres rendant compte des expériences précédentes. Il faut cependant ajouter que le nombre de sites obtenus par cette méthode est moindre (sauf pour le poly[d(AT)]). Une parfaite concordance pour les points à C_T élevé nous oblige par ailleurs à envisager l'existence d'un site d'affinité plus faible que nous ne décelons pas sur les isothermes de Scatchard (fig.III,6 à III,8). Cependant, remarquons que cette méthode a surtout été utilisée pour la détermination de ε_c. Elle a seulement servi à vérifier les résultats précédents. Aussi n'avons-nous pas purifié au préalable les produits par dialyse comme

cela s'est avéré nécessaire pour l'obtention d'isothermes de Scatchard convenables par microdialyse. D'autre part, l'utilisation de fortes concentrations de DNA permet probablement de déceler l'empilement des molécules de colorant le long de la chaîne des phosphates. Enfin , l'étude spectroscopique rend surtout compte des phénomènes prédominant à r élevé (r>o,1), où la concentration en colorant libre est loin d'être négligeable et où les interactions entre molécules libres de tilorone sont détectables (cf.fig.III,3).

Tous ces artefacts possibles rendent illusoire une détermination précise des paramètres ; c'est pourquoi nous ne retiendrons de ces résultats que leur compatibilité avec ceux des microdialyses.

III. 4. Etude cinétique de l'association tilorone - DNA et polynucléotides par saut de température.

La méthode du saut de température est une technique adaptée à l'étude de l'interaction des colorants avec les acides nucléiques. Divers auteurs l'ont utilisée pour la détermination des paramètres cinétiques de l'interaction des aminoacridines telles que la proflavine[47-49] et le bromure d'éthidium[50] avec les polynucléotides. Les temps de relaxation qui caractérisent ces différents systèmes (supérieurs à la milliseconde pour l'étape dite "d'intercalation") confèrent à la méthode du saut de température une nette supériorité sur la méthode de l'écoulement bloqué qui a été utilisée près de sa limite de résolution pour l'étude de l'interaction de l'acridine orange[51] avec le DNA et qui ne permet pas de mesurer les temps de relaxation associés aux étapes plus rapides. La tilorone s'apparente à plus d'un titre aux aminoacridines tant par son mode d'interaction avec le DNA que par sa structure ; la cinétique de cette interaction a donc été étudiée par la méthode du saut de température. Quelques essais effectués au moyen des méthodes du saut de pression et de perturbation par onde de choc ont donné des résultats négatifs, indiquant que la variation de volume de la réaction est faible .

A. Conditions expérimentales : La plupart des mesures ont été effectuées dans les conditions "standard" définies plus haut : 0,1 *M* NaCl + 0,002 *M* tampon phosphate pH = 7, 20° C. La tilorone ne donnant pas lieu à une émission de fluorescence mesurable, seule une détection par absorption lumineuse a été possible. Nous avons utilisé de ce fait une longueur d'onde de 265 nm, pic

d'émission de la lampe au xénon-mercure où le colorant fixé présente une forte hypochromicité par rapport au colorant libre. L'inconvénient majeur de ce choix réside dans l'absorption simultanée du DNA à cette longueur d'onde, ce qui a fortement limité le domaine d'étude en fonction de la concentration. Mais il s'est avéré nécessaire de ne pas s'éloigner du maximum du pic d'absorption de la tilorone (270 nm), car certaines relaxations disparaissent au delà de 280 nm. Contrairement à d'autres auteurs[40], il ne nous a pas été possible d'utiliser le pic d'absorption de la tilorone à 470 nm, les concentrations de DNA requises étant alors trop fortes.
Le DNA utilisé a été dégradé par ultrasons de façon à avoir une masse moléculaire d'environ 500.000. Nous avons vérifié que cette dégradation n'influe pas sur les résultats.

Les concentrations en colorant et en site libres ont été calculées à partir des isothermes de Scatchard qui sont présentées dans le paragraphe précédent (figures III,6 à III,8). Ces isothermes sont pratiquement linéaires, montrant ainsi l'indépendance des constantes d'équilibre apparentes vis-à-vis de r. Les études en fonction de la concentration ont néanmoins été effectuées à r constant. Pour cela, nous avons d'abord mesuré les temps de relaxation avec des solutions concentrées, puis opéré des dilutions successives au moyen d'une solution de tilorone à la concentration $\overline{C}_D$ et à la force ionique de l'expérience.

B. Résultats

Le signal de relaxation du système DNA-Tilorone en 0,1 *M* NaCl présente trois temps de relaxation (exemple figure II,10)

$\tau_1 \simeq 200$ µs : $1/\tau_1$ est indépendant de $\bar{C}_P + \bar{C}_D$

$\tau_2 \simeq 2$ ms : $1/\tau_2$ varie quasi linéairement en fonction de $\bar{C}_P + \bar{C}_D$

$\tau_3 \simeq 20$ ms : $1/\tau_3$ varie non linéairement en fonction de $\bar{C}_P + \bar{C}_D$

$\bar{C}_P + \bar{C}_D$ *étant la somme des concentrations de site du DNA et de colorant libres.*

Etant donné la complexité du spectre de relaxation, nous avons étudié, pour simplifier le problème, la fixation de la tilorone sur des molécules modèles ne présentant qu'un type de site telles que le poly[d(A-T)] et le poly(dG)-poly(dC).

1) Interaction tilorone - poly[d(A-T)] en 0,1 *M* NaCl.

L'étude à r = 0,1 a permis de caractériser deux temps de relaxation correspondant à τ_2 et à τ_3. Leur variation en fonction de la concentration est représentée par les figures III,12 et III,13. Malgré un signal total de grande amplitude, il n'a pas été possible de mesurer avec une précision suffisante la variation de τ_2 en fonction de $\bar{C}_P + \bar{C}_D$, l'amplitude de τ_3 étant relativement beaucoup plus forte : par exemple, un saut de température de 5°C, pour $\bar{C}_P + \bar{C}_D = 1,5 \cdot 10^{-5}$ *M*, donne une amplitude du

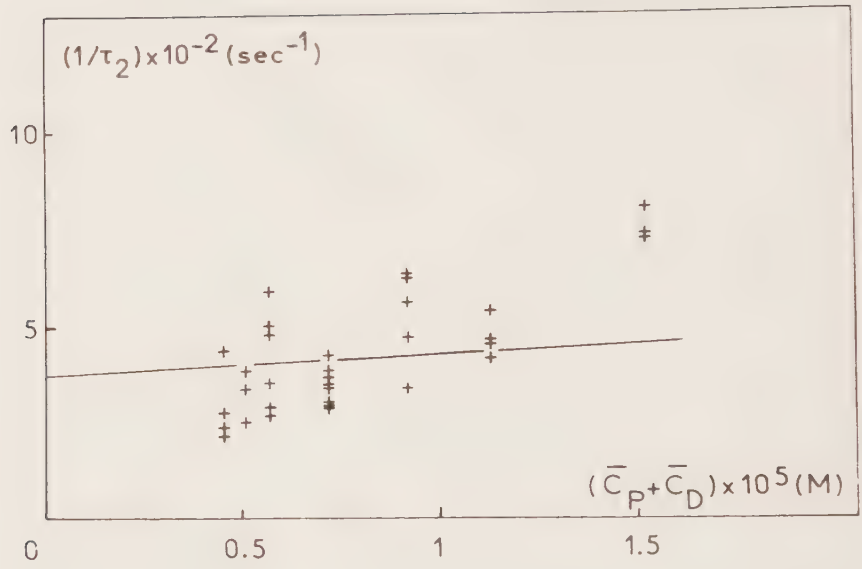


Figure III,12 : Association tilorone - poly[d(A-T)] : Variation de $1/\tau_2$ fonction de $\bar{C}_P + \bar{C}_D$ à 20°C, μ = 0,1 , pH = 7 et r = 0,1. Longueur d'onde d'observation : 265 nm.

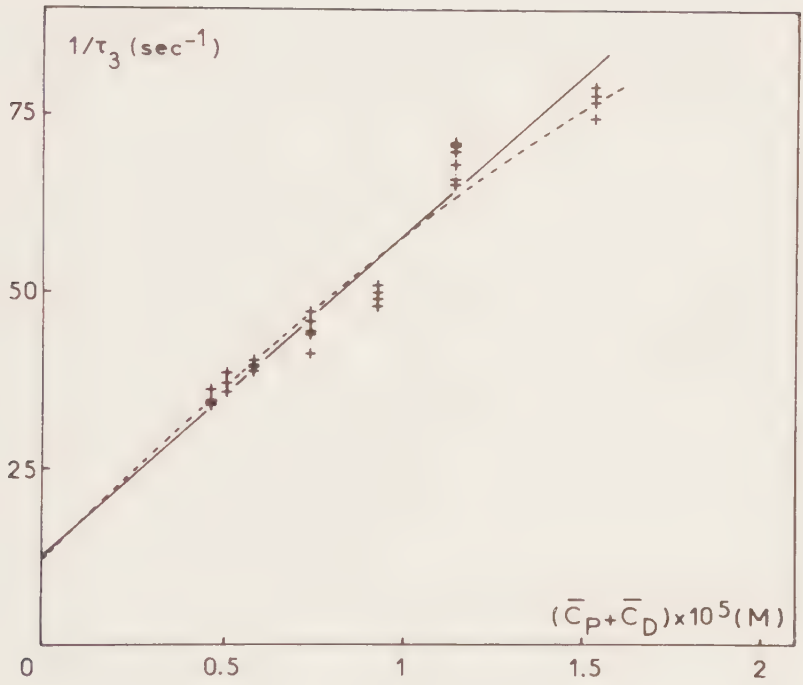


Figure III,13 : Association tilorone - poly[d(A-T)] : Variation de $1/\tau_3$ en fonction de $\bar{C}_P + \bar{C}_D$ à 20°C, μ = 0,1 , pH = 7 et r = 0,1. Longueur d'onde d'observation : 265 nm.

signal total de 1 % dont 0,2 % correspondent à τ_2 et 0,8 % à τ_3. Nous avons testé différents modèles cinétiques et nous nous limiterons à la description des deux modèles rendant compte à la fois des résultats de stoechiométrie et de cinétique. Pour ces deux modèles, le mécanisme réactionnel est identique :

$$P + D \rightleftharpoons C_I \rightleftharpoons C_{II} \qquad \text{(III,4,1)}$$

a) τ_3 correspond à l'association (lente) et τ_2 à l'isomérisation (rapide) :

Dans ce cas, τ_3 varie linéairement avec $\bar{C}_P + \bar{C}_D$ (figure III,13) et τ_2 ne varie pas avec cette quantité (voir § I,3,A,b). Ce modèle est en accord avec les résultats expérimentaux et le calcul aboutit aux constantes de vitesse suivantes :

$$\left\{ \begin{array}{l} k_3 = 4{,}6.10^6\ M^{-1}\text{sec}^{-1} \\ \dfrac{k_{-3}}{1 + K_2} = 12\ \text{sec}^{-1} \\ k_2 + k_{-2} = 400\ \text{sec}^{-1} \\ K_{app} = K_3\ (1 + K_2) = 380.000\ M^{-1} \end{array} \right. \qquad \text{(III,4,2)}$$

b) τ_2 correspond à l'association (rapide) et τ_3 à l'isomérisation (lente) :

La variation de $1/\tau_3$ en fonction de $\bar{C}_P + \bar{C}_D$ rend alors compte de l'expérience pour les valeurs des constantes suivantes (cor-

respondant à la courbe en pointillé de la figure III,13) :

$$\left\{\begin{array}{lll} k_3 = 350\ sec^{-1} & & \\ k_{-3} = 12\ sec^{-1} & & \\ K_2 = 15.000\ M^{-1} & K_{app} = 450.000\ M^{-1} & \end{array}\right. \qquad (III,4,3)$$

La constante K_2 ainsi obtenue permet de déterminer les constantes k_2 et k_{-2} donnant une droite en accord avec les points expérimentaux. La droite représentée sur la figure III,12 correspond ainsi à :

$$\begin{array}{l} k_2 = 5{,}5.10^6\ M^{-1}sec^{-1} \\ \\ k_{-2} = 370\ sec^{-1} \end{array} \qquad (III,4,4)$$

Dans les deux hypothèses, la constante K_{app} calculée est à comparer avec la valeur K_{app} = 440.000 déterminée par stoechiométrie.

2) Interaction tilorone - poly(dG)-poly(dC) en 0,1 *M* NaCl.

L'étude à r = 0,065 a mis en évidence deux temps de relaxation correspondant à τ_1 et à τ_2. Leur variation en fonction de la concentration est représentée par les figures III,14 et III,15 ; elle est en bon accord avec le schéma réactionnel suivant :

$$P + D \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} C_I \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} C_{II} \qquad (III,4,5)$$

τ_2 $\qquad$ τ_1

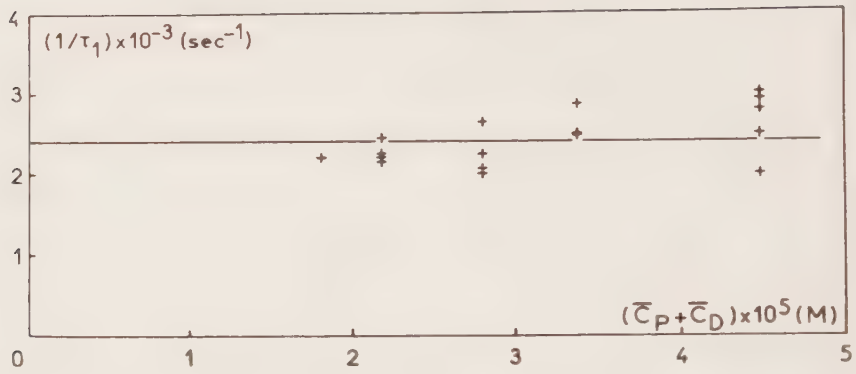


Figure III,14 : Association tilorone - poly(dG)-poly(dC) : Variation de $1/\tau_1$ en fonction de $\overline{C}_P + \overline{C}_D$ à 20°C, μ = 0,1 , pH = 7 et r = 0,065. Longueur d'onde d'observation : 265 nm.

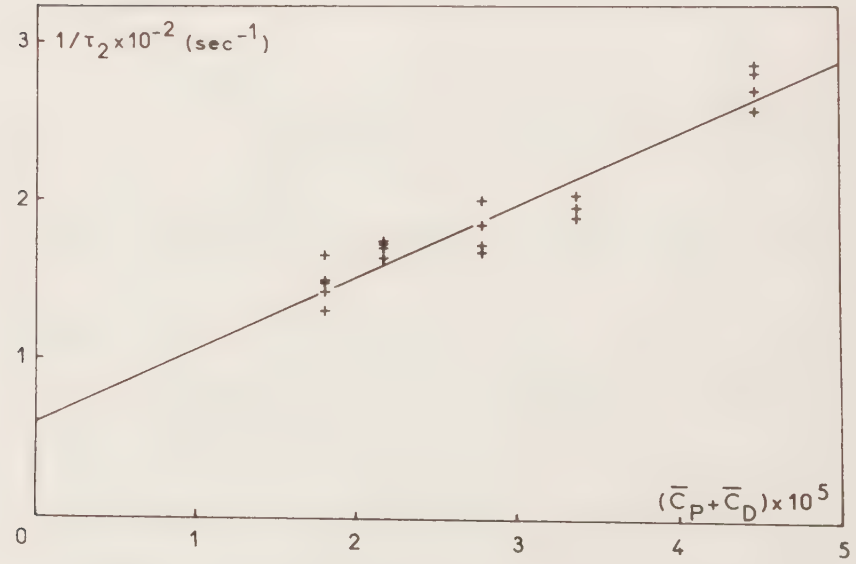


Figure III,15 : Association tilorone - poly(dG)-poly(dC) : Variation de $1/\tau_2$ en fonction de $\overline{C}_P + \overline{C}_D$ à 20°C, μ = 0,1 , pH = 7 et r = 0,065. Longueur d'onde d'observation : 265 nm.

Les valeurs des constantes de vitesse sont alors :

$$\begin{cases} k_2 = 4{,}5.10^6 \ M^{-1}\text{sec}^{-1} \\ \dfrac{k_{-2}}{1 + K_1} = 60 \ \text{sec}^{-1} \\ k_1 + k_{-1} = 2400 \ \text{sec}^{-1} \end{cases} \qquad \text{(III,4,6)}$$

soit $K_{app} = K_2(1 + K_1) = 75.000 \ M^{-1}$

Là encore, on obtient une constante d'équilibre identique à celle déterminée par stoechiométrie.

3) Interaction Tilorone - DNA T.V.

La variation des trois temps de relaxation énumérés en début de paragraphe en fonction de $\overline{C}_P + \overline{C}_D$ a été étudiée pour différentes valeurs du taux de fixation, de la température et de la force ionique.

a) Etude en fonction de $\overline{C}_P + \overline{C}_D$ à différentes valeurs du taux de fixation :

Les figures III,16 à III,19 représentent les variations de τ_1, τ_2 et τ_3 en fonction de $\overline{C}_P + \overline{C}_D$. On peut remarquer que :

- les points expérimentaux se placent sur la même courbe, quel que soit r.
- $1/\tau_1$ et $1/\tau_3$ ont pu être mesurés à des valeurs beaucoup plus fortes de $\overline{C}_P + \overline{C}_D$ en détectant le signal à des lon-

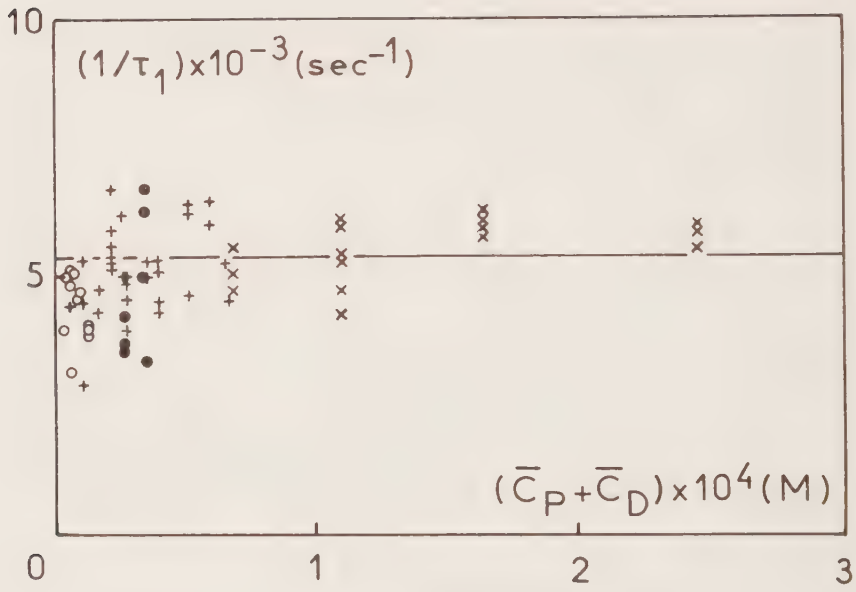


Figure III,16 : Association tilorone - DNA T.V. : Variation de $1/\tau_1$ en fonction de $\bar{C}_P + \bar{C}_D$ à 20°C, μ = 0,1; pH = 7. Longueur d'onde d'observation : 265 nm pour r = 0,025 (○), r = 0,058 (+) et r = 0,1 (●) ; longueur d'onde d'observation = 290 nm pour r = 0,058 (×).

gueurs d'onde où le DNA a une absorption faible ou nulle (figure III,16 et III,19 respectivement). Le mode de variation de ces deux temps est ainsi déterminé de manière univoque.

- l'incertitude sur $1/\tau_2$ est grande et nous oblige à émettre plusieurs hypothèses sur la nature de l'étape réactionnelle qu'il caractérise.

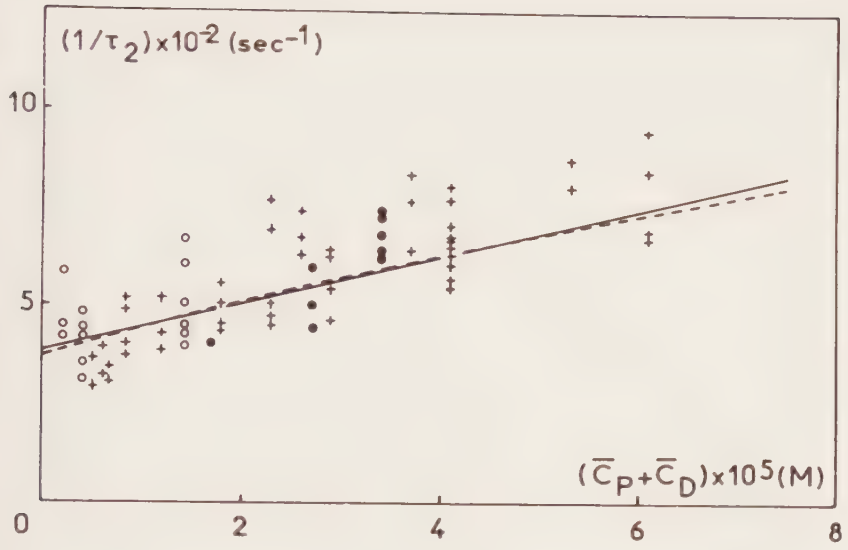


Figure III,17 : Association tilorone - DNA T.V. : Variation de $1/\tau_2$ en fonction de $\bar{C}_P + \bar{C}_D$ à 20°C, $\mu = 0,1$ pH = 7 et $\lambda = 265$ nm. (o) r = 0,025, (+) r = 0,058 et (o) r = 0,1.

Signalons d'autre part que l'influence de r sur les amplitudes de relaxation est grande pour τ_3, faible pour τ_2 et minime pour τ_1.

Pour assigner un mécanisme d'interaction au système tilorone - DNA, nous reprendrons les différentes possibilités envisagées lors de l'étude stoechiométrique (section III,3) :

1. La fixation se fait sur deux sites indépendants correspondant à des sites $\begin{bmatrix} A\text{-}T \\ T\text{-}A \end{bmatrix}$ (P_1) et à des sites du type trouvé dans le poly(dG)-poly(dC) (P_2). La combinaison des schémas réactionnels indiqués aux paragraphes III,4,1 et III,4,2 conduit alors à pro-

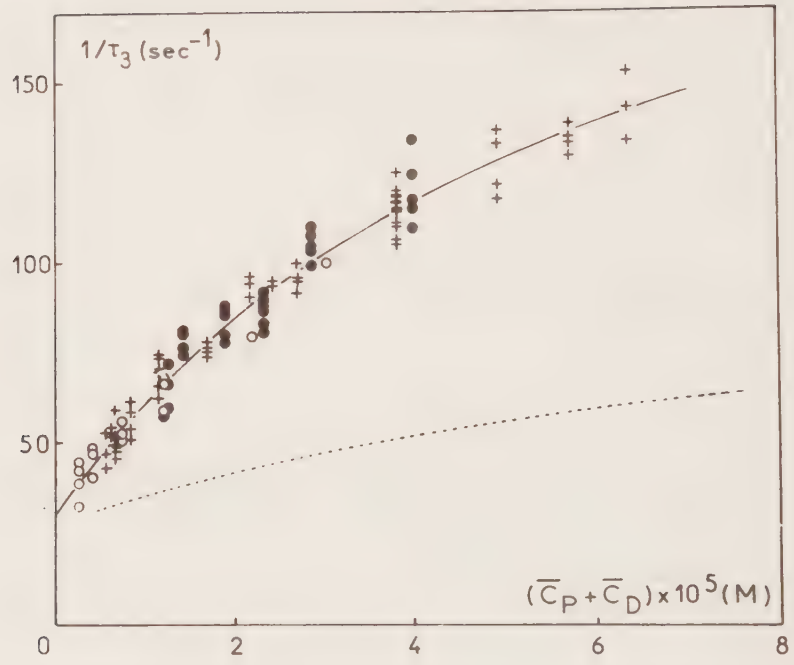
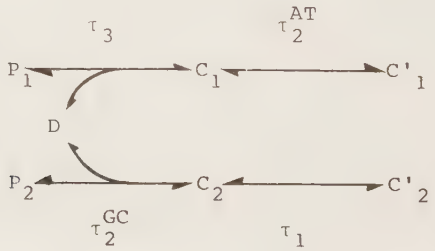


Figure III,18 : Association tilorone - DNA T.V. : Variation de $1/\tau_3$ en fonction de $\bar{C}_P + \bar{C}_D$ à 20°C, μ = 0,1 , pH = 7 et λ = 265 nm (○) r = 0,025 , (+) r = 0,058 et (●) r = 0,1.

poser les mécanismes suivants :



(III,4,7)

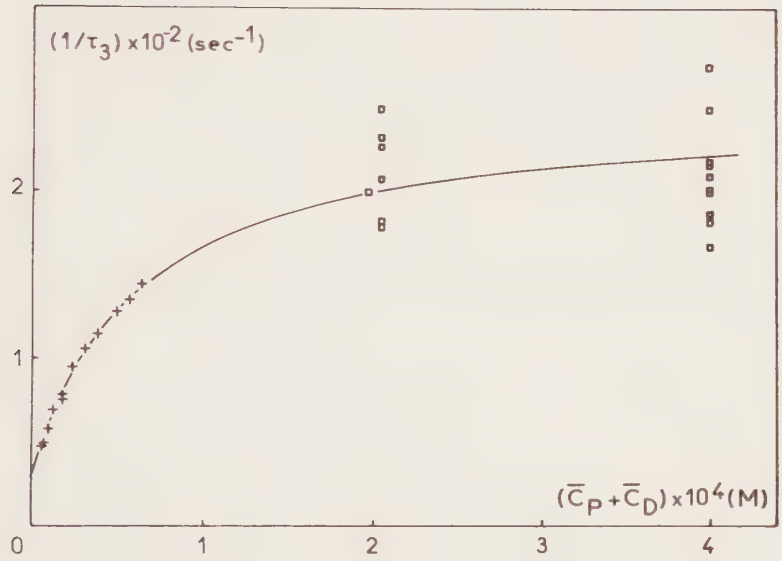
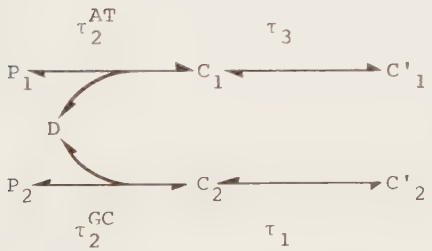


Figure III,19 : Association tilorone - DNA T.V. : Variation de $1/\tau_3$ en fonction de $\bar{C}_P + \bar{C}_D$ à 20° C, μ = 0,1, pH = 7 ;(+) Moyennes des points obtenus à différents r et pour λ = 265 nm ; (□) r = 0,1 et λ = 365 nm.

ou



(III,4,8)

Dans les deux cas, le temps de relaxation τ_2 mesuré serait en fait une combinaison de deux temps très voisins correspondant à une étape particulière à chaque site ; expérimentalement, on

n'observerait donc que trois temps de relaxation.
Pour de tels schémas réactionnels exploités avec des valeurs des constantes compatibles avec la stoechiométrie, les courbes théoriques de variation de $1/\tau_3$ en fonction de $\overline{C}_P + \overline{C}_D$ s'apparentent dans le meilleur cas à la courbe en pointillé de la figure III,18 ; ces deux mécanismes sont donc à rejeter, éliminant par la même occasion la deuxième hypothèse envisagée à la page 100.

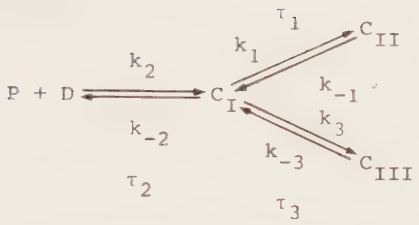
2. L'étude cinétique ne permet pas de choisir entre les deux autres cas envisagés lors de l'étude à l'équilibre. En effet, dans l'hypothèse de l'existence d'un site très spécifique (n = 0,008) et de grande affinité ($K = 2.10^6$) (modèle 2), le facteur d'amplitude du (ou des) temps de relaxation associé à ce site serait très petit, rendant ainsi sa détection très difficile. Les trois temps de relaxation observés seraient alors caractéristiques du "site" non spécifique détectable (modèle 2) ou unique (modèle 1 à isotherme linéaire). D'ailleurs l'indépendance des temps de relaxation par rapport à r va de pair avec celle de K_{app} en fonction de r.

Les calculs ont été effectués avec n = 0,15 dans l'hypothèse d'une isotherme linéaire. Deux modèles rendent alors compte des résultats cinétiques et de l'isotherme linéaire :

$$(A)\quad P + D \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} C_I \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} C_{II} \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} C_{III} \qquad (III,4,9)$$

$$\tau_2 \qquad \tau_1 \qquad \tau_3$$

et

(B)  (III,4,10)

Les expressions des temps de relaxation pour ces deux mécanismes réactionnels sont :

$$1/\tau_1 = k_1 + k_{-1}$$

$$1/\tau_2 = k_2(\bar{C}_P + \bar{C}_D) + k^*_{-2} \qquad \text{(III,4,11)}$$

$$1/\tau_3 = k_{-3} + k^*_3 \frac{\bar{C}_P + \bar{C}_D}{1/K^*_2 + \bar{C}_P + \bar{C}_D}$$

avec, dans les deux cas:

$$k^*_{-2} = \frac{k_{-2}}{1 + K_1}$$

$$K^*_2 = K_2(1 + K_1)$$

$$K_{app} = \frac{k_2}{k^*_{-2}}(1 + \frac{k^*_3}{k_{-3}})$$

mais: $k^*_3 = k_3 \frac{K_1}{1 + K_1}$ pour (A)

et $k^*_3 = \frac{k_3}{1 + K_1}$ pour (B)

Les figures III, 16 à III,19 donnent :

$$\left\{\begin{array}{ll} k_1 + k_{-1} = 5400\ sec^{-1} & \\ k_2 = 6.10^6\ M^{-1}\ sec^{-1} & k^*_{-2} = 380\ sec^{-1} \\ k^*_3 = 220\ sec^{-1} & k_{-3} = 30\ sec^{-1} \\ K_{app} = 135.000\ M^{-1} & \end{array}\right. \qquad \text{(III,4,12)}$$

Il n'est pas indispensable de considérer que l'étape engendrant τ_2 est une étape d'association bimoléculaire simple. Il semble d'ailleurs que cela ne soit pas le cas, étant donné la valeur de la constante de vitesse k_2 qui diffère de presque trois ordres de grandeur de celle qui est attendue pour une étape diffusive faisant intervenir une molécule de taille comparable aux mononucléotides[52]. Deux hypothèses peuvent alors être proposées:

α) On peut admettre , de même que DOURLENT [49] dans le cas de l'interaction DNA-proflavine, qu'en fait l'étape d'association est beaucoup plus rapide et que la constante d'association K'_2 qui lui est associée est faible en force ionique 0,1 , car les phénomènes électrostatiques y sont prépondérants. Les étapes d'association des schémas (A) et (B) sont donc à remplacer par

$$P + D \underset{k'_{-2}}{\overset{k'_2}{\rightleftharpoons}} C_o \underset{k''_{-2}}{\overset{k''_2}{\rightleftharpoons}} C_1 \qquad \text{(III,4,13)}$$

où C_o apparaît comme étant un état stationnaire non détectable.

Un seul temps de relaxation est alors associé au schéma III,4,13 ; son expression est :

$$1/\tau_2 = \frac{k'_2}{1 + S} (\bar{C}_P + \bar{C}_D) + \frac{k'_{-2}}{K''_2 (1 + S)} \qquad \text{(III,4,14)}$$

$$\text{avec } S = \frac{k'_{-2}}{k''_2}$$

On aurait ainsi :

$$k_2 = \frac{k'_2}{1 + S} \quad \text{et} \quad k_{-2} = \frac{k'_{-2}}{K''_2 (1 + S)}$$

La droite obtenue pour $1/\tau_2 = f(\bar{C}_P + \bar{C}_D)$ (figure III,17) est en accord avec cette expression.

ß) On peut encore considérer que les points expérimentaux de la figure III,17 ne sont pas sur une droite, mais sur une branche d'hyperbole correspondant à une étape couplée avec une étape rapide de constante d'équilibre K_o . Le temps de relaxation τ_o ne serait pas visible soit parce qu'il est trop rapide, soit parce que son amplitude est nulle (il n'y aurait pas de variation du coefficient d'extinction par exemple — *cf.* paragraphe I,3,B —). La pente à l'origine de la courbe est alors donnée par $k_2 K_o$; étant donné l'impossibilité d'étudier la variation de $1/\tau_2$ dans un domaine suffisamment large de $\bar{C}_P + \bar{C}_D$, tout couple de valeurs k_2 et K_o dont le produit est environ égal à $6.10^6\ M^{-1}sec^{-1}$ convient si $K_o < 2.000\ M^{-1}$. La courbe en pointillé de la figure III,17 représente à titre d'exemple la variation de $1/\tau_2$ en fonction de $\bar{C}_P + \bar{C}_D$ pour $K_o = 1.600\ M^{-1}$ et $k_2 = 4.000\ sec^{-1}$.

b) Etude en fonction de $\overline{C}_P + \overline{C}_D$ à différentes températures.

D'après la loi d'Arrhénius, la connaissance des constantes de vitesse à différentes températures permet de déterminer les enthalpies et les entropies d'activation qui leur sont associées. Pour cela, on représente le logarithme de la constante de vitesse en fonction de l'inverse de la température absolue (courbe d'ARRHENIUS). On obtient en général des droites d'équation :

$$\ln K = -\frac{\Delta H^{\ddagger}}{RT} + \frac{\Delta S^{\ddagger}}{R} + \ln \frac{RT}{h\mathcal{N}} + 1 \qquad \text{(III,4,15)}$$

où $\Delta H^{\ddagger}$ *est l'enthalpie d'activation de la demi-réaction considérée,*
$\Delta S^{\ddagger}$ *l'entropie d'activation de la demi-réaction considérée,*
$\mathcal{N}$ *le nombre d'Avogadro* ($6{,}02.10^{23}$)
h *la constante de Planck* ($6{,}62.10^{-34}$ J.sec),
T *la température absolue*
et R *la constante des gaz parfaits.*

La figure III,20 représente la variation de $1/\tau_3$ en fonction de $\overline{C}_P + \overline{C}_D$ à 10° C et à 35°C. Les valeurs de k_3^* et de k_{-3} à 10°, 20° et 35° permettent de tracer des droites vérifiant l'équation III,4,15 (figure III,21). On obtient ainsi :

$$\begin{cases} (\Delta H^{\ddagger})_3^* = 10{,}2 \text{ kcal/mole} & (\Delta S^{\ddagger})_3^* = -15{,}4 \text{ u.e.} \\ (\Delta H^{\ddagger})_{-3} = 18{,}4 \text{ kcal/mole} & (\Delta S^{\ddagger})_{-3} = +8{,}4 \text{ u.e.} \end{cases} \qquad \text{(III,4,16)}$$

Les enthalpies et les entropies d'activation conduisent aux valeurs de l'enthalpie et de l'entropie de la réaction normale considérée :

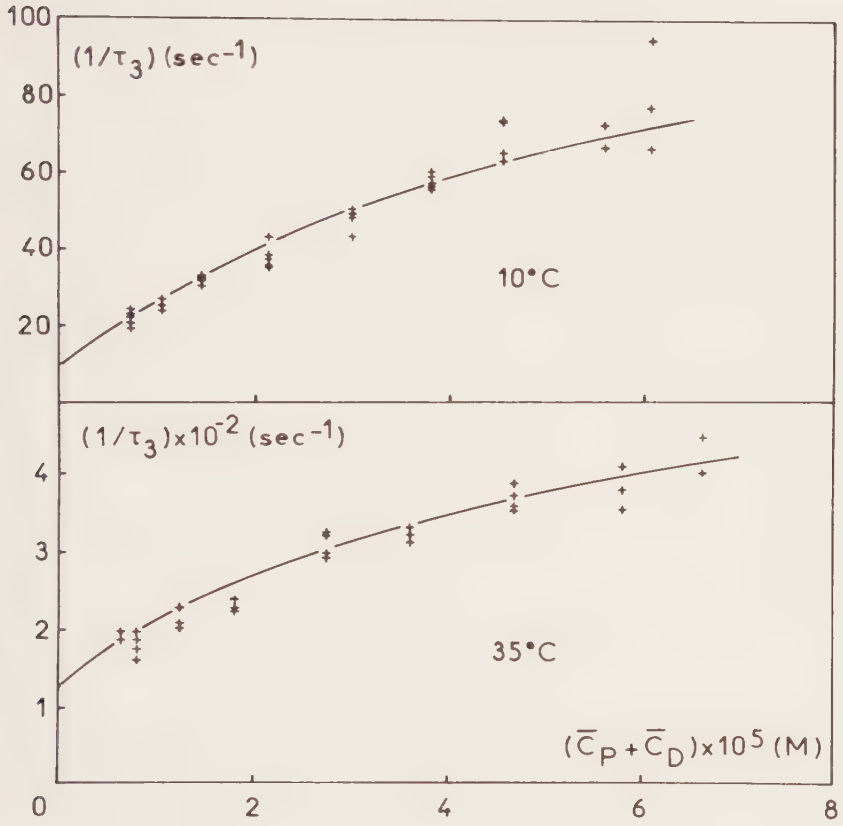


Figure III,20 : Association tilorone - DNA T.V. : Variation de $1/\tau_3$ en fonction de $\overline{C}_P + \overline{C}_D$ à 10°C et à 35°C ; μ = 0,1 , pH = 7, r = 0,058 et λ = 265 nm.

$$\left\{\begin{array}{l} \Delta H_3^* = -8{,}2 \text{ kcal/mole} \\ \Delta S_3^* = -24 \text{ u. e.} \end{array}\right. \qquad \text{(III,4,17)}$$

Ces valeurs nous permettent de recalculer K_3^* ; en effet :

$$\Delta G_3^* = -RT \ln K_3^* \qquad \text{(III,4,18)}$$

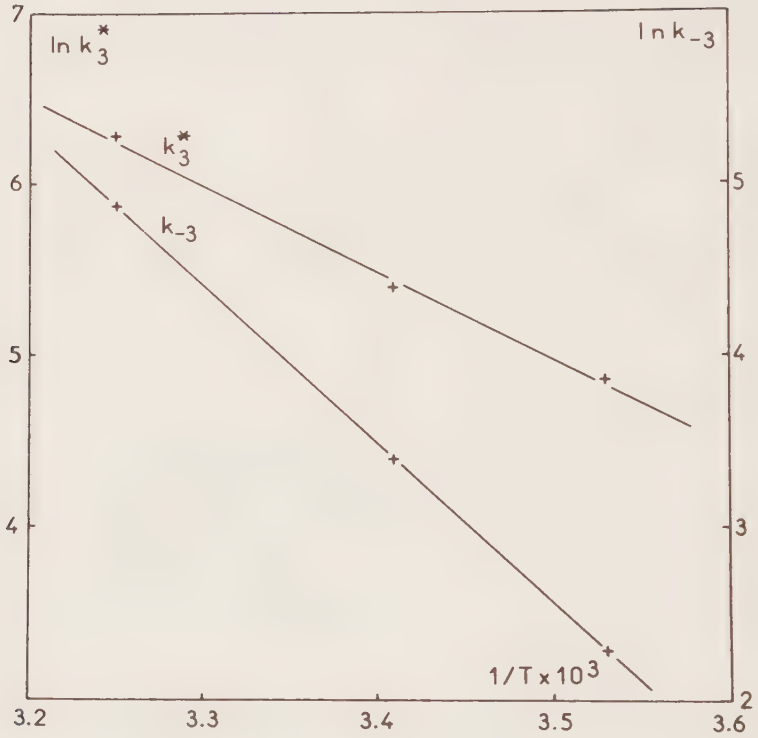


Figure III,21 : Association tilorone - DNA T.V. : variation de ln k_3^* et de ln k_{-3} en fonction de 1/T pour μ = 0,1 , pH = 7.

d'où $K_3^* = 8,2$ à 20°C, en bon accord avec la valeur expérimentale $K_3^* = k_3^* / k_{-3} = 7,3$

Les variations des constantes de vitesse correspondant aux autres temps de relaxation ont été mesurées. Malheureusement, la marge d'erreur est trop grande pour une exploitation quantitative de ces résultats.

c) Etude en fonction de $\overline{C}_P + \overline{C}_D$ en 0,01 *M* NaCl :

Nous avons effectué quelques mesures en faible force ionique (μ= 0,01) pour un taux de fixation r = 0,1 (nous avons alors : $r/\overline{C}_D$ = 120.000 et n = 0,16 d'après L.SCHREIBER, résultats non publiés). Dans ces conditions, nous n'avons observé que deux temps de relaxation correspondant à τ_1 et à τ_2. Les figures III,22 et III,23 représentent leur variation en fonction de $\overline{C}_P + \overline{C}_D$. Nous obtenons ainsi :

$$\left\{\begin{array}{l} k_2 = 3{,}6.10^7\ M^{-1}\text{sec}^{-1} \\ \dfrac{k_{-2}}{1 + K_1} = 140\ \text{sec}^{-1} \\ \text{soit} \quad K_2\ (1 + K_1) = 2{,}5.10^5\ M^{-1} \\ k_1 + k_{-1} = 3.000\ \text{sec}^{-1} \end{array}\right. \qquad \text{(III,4,19)}$$

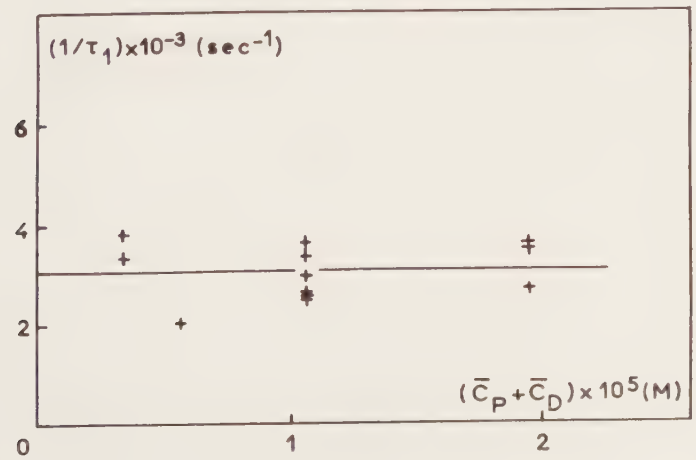


Figure III,22 : Association tilorone - DNA T.V. : Variation de $1/\tau_1$ en fonction de $\overline{C}_P + \overline{C}_D$ à 20°C, μ = 0,01 , pH = 7, λ = 265 nm et r = 0,1.

Les paramètres stoechiométriques indiqués ci-dessus permettent de calculer $K_{app} = 2.10.^{6}$. On peut en déduire $K_3^{*} = 7$, valeur proche de celle trouvée en 0,1 *M* NaCl. Il semble donc que l'étape 3 existe en 0,01 *M* NaCl bien que nous n'ayons pas décelé la présence de τ_3 ; il faut alors admettre que l'un des facteurs figurant dans l'expression de l'amplitude A_3 est nul. Nous remarquons d'autre part que l'étape d'association est fortement dépendante de la force ionique, dénotant probablement une contribution électrostatique ; l'étape 3 semble au contraire être indépendante de la force ionique,

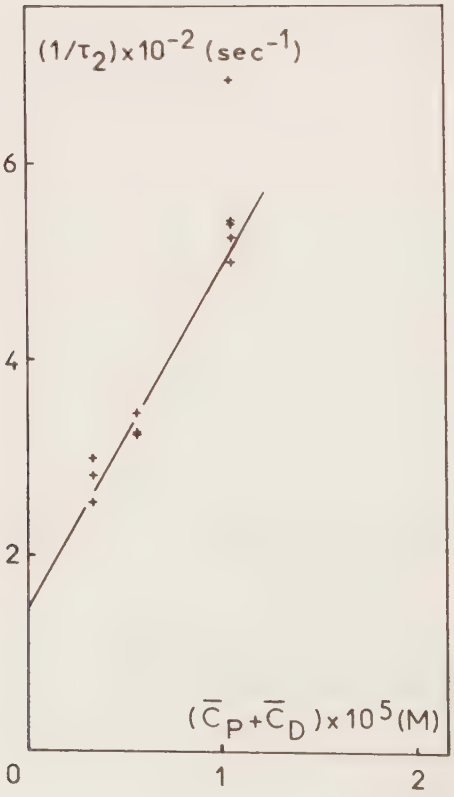
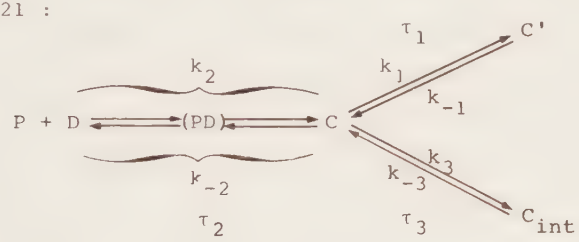


Figure III,23 : Association tilorone - DNA T.V. : Variation de $1/\tau_2$ en fonction de $\overline{C}_P + \overline{C}_D$ à 20°C, μ = 0,01, pH = 7, λ = 265 nm et r = 0,1.

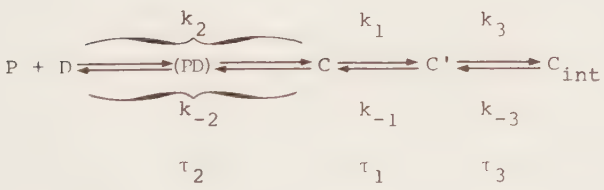
mettant en évidence une interaction qui ne fait pas intervenir les phosphates.

C. Discussion.

Les sections III,3 et III,4 nous ont conduit à retenir deux mécanismes réactionnels rendant compte des résultats expérimentaux. Ces deux mécanismes sont représentés par les schémas III,4,20 et III,4,21 :



(III,4,20)



(III,4,21)

(PD) étant à l'état stationnaire.

Nous avons vu que la tilorone s'intercalait dans le DNA et dans le poly[d(A-T)], mais que le signal de dichroïsme circulaire était nul avec le poly(dG)-poly(dC), indiquant probablement une absence d'intercalation dans ce polymère : or, τ_3 est absent pour le poly(dG)-poly(dC). De plus, la constante d'équilibre K_3^* semble ne pas varier en fonction de la force ionique. Il est donc logique de songer à un

site d'intercalation pour C_{int}.

* Dans le cas du mécanisme III,4,20, la tilorone, une fois fixée sur le site C du DNA, a deux possibilités d'augmenter son interaction : elle peut former soit le complexe C', soit le complexe C_{int}. Comme τ_1 est absent avec le poly[d(A-T)], et τ_3 avec le poly(dG)-poly(dC), les deux polynucléotides de synthèse seraient des molécules modèles où seul le site C' serait occupé pour le poly(dG)-poly(dC) et le site C_{int} pour le poly[d(A-T)]. Le site C_{int} serait toujours potentiellement présent (n = 0,16), mais l'état dynamique du polynucléotide règle la proportion statistique de sites C' et de sites C_{int}.

* Dans le cas du mécanisme III,4,21, une première complexation de la tilorone (état C) est suivie d'une"intercalation partielle" (état C') qui est possible pour tous les polynucléotides. Lorsque l'état dynamique de la double hélice le permet, il y a intercalation complète en partant des sites C' (état C_{int}). Là encore, l'état dynamique réglerait la proportion des sites C' et des sites C_{int}.
Pour le poly(dG)-poly(dC), cet état dynamique empêcherait l'étape d'intercalation aboutissant à C_{int} tandis que pour le poly[d(A-T)], l'état C' serait tellement défavorisé par rapport à C_{int} qu'il se trouverait à l'état stationnaire ; l'amplitude de τ_1 serait alors nulle et τ_3 correspondrait à la partie du mécanisme allant de C à C_{int}.
Ces considérations sur les résultats obtenus pour les divers polynucléotides nous conduisent donc, dans le cas du poly[d(A-T)], à éliminer le cas a) envisagé page 110 et à choisir le mécanisme où

τ_2 correspond à l'association et τ_3 à l'isomérisation.

En ce qui concerne l'étape d'association, remarquons que les valeurs des constantes de vitesse k_2 sont voisines :

$k_2 = 5{,}5.10^6 \quad M^{-1} \text{ sec}^{-1}$ pour le poly[d(A-T)]
$k_2 = 6.10^6 \quad M^{-1} \text{ sec}^{-1}$ pour le DNA
$k_2 = 4{,}5.10^6 \quad M^{-1} \text{ sec}^{-1}$ pour le poly(dG)-poly(dC)

dénotant une bonne cohérence des résultats. Nous renvoyons à la page 120 où nous avons déjà exposé les raisons qui nous ont fait envisager le mécanisme III,4,13 et qui justifient les valeurs de k_2 trop faibles pour être imputables à la constante de vitesse d'une étape diffusive.

La valeur négative obtenue pour ΔS_3^* (relation III,4,17) appelle également un commentaire. En effet, pour une intercalation, on s'attendrait à trouver une variation d'entropie standard positive, comme pour la plupart des autres colorants[60] : en effet, l'augmentation d'entropie due à l'écartement des paires de bases devrait être plus forte que la diminution d'entropie due à l'insertion du colorant entre ces bases.

* Dans le cas du mécanisme III,4,20, ce signe négatif peut facilement s'interpréter si l'on suppose que ΔS_1 est fortement positif. En effet, la relation III,4,11 nous permet d'écrire :
$\ln k_3^* = \ln k_3 - \ln (1 + K_1)$.
La valeur ΔS_3^* mesurée expérimentalement serait en fait la résultante des termes entropiques provenant de k_3 et de K_1. Par conséquent, $\ln k_3$ pourrait être bien plus grand que $\ln k_3^*$, et ΔS_3

pourrait être positif et en accord avec les considérations sur l'intercalation.

* Dans le cas du mécanisme III,4,21, une telle interprétation n'est pas possible ; en effet, la relation III,4,11 donne :

$$\ln k_3^* = \ln k_3 + \ln K_1 - \ln (1 + K_1) \simeq \ln k_3$$

$$\text{si } K_1 >> 1$$

Pour avoir un ΔS_3^* négatif, on peut alors envisager une interaction supplémentaire entre colorant et DNA qui se ferait simultanément avec l'intercalation (par exemple une interaction de l'éthoxy des chaînes latérales avec le groupe $-NH_2$ de l'adénine).

Sans choisir entre les modèles proposés, on peut essayer de donner une interprétation physique au site C'. Le fait que l'étape correspondant à τ_1 soit la plus rapide et qu'elle soit détectable exige qu'il y ait une variation du coefficient d'extinction de la tilorone lorsque celle-ci passe de l'état C à l'état C' (cf. relation 1,3,17). On peut dès lors énumérer différentes possibilités d'interactions :

* Dans le cas du mécanisme III,4,20 :

- interaction entre molécules de tilorone se trouvant dans l'état C_2 (empilement) à raison d'une molécule de colorant pour trois plateaux de bases.
- formation de liaison hydrogène entre une base et l'oxygène cétonique de la fluorénone.
- intercalation partielle de la tilorone dans le sillon

de la chaîne bicaténaire où l'intercalation complète ne peut se faire; une fois fixé sur un phosphate par une charge, le colorant aurait le choix pour pivoter dans l'un (C') ou l'autre (C_{int}) des sillons pour former une liaison avec un deuxième phosphate.

* Dans le cas du mécanisme III,4,21 :
  - intercalation partielle de la tilorone (site C') pouvant donner lieu, grâce à la respiration du DNA, à un site C_{int}.

Dans les deux cas, le site C_{int} serait donc considérablement favorisé par un état dynamique global de la macromolécule permettant l'intercalation et dépendant de la richesse en plateaux (A-T).

Pour justifier un nombre de sites égal à 0,16 par nucléotide, on peut envisager l'interaction de la tilorone avec deux phosphates

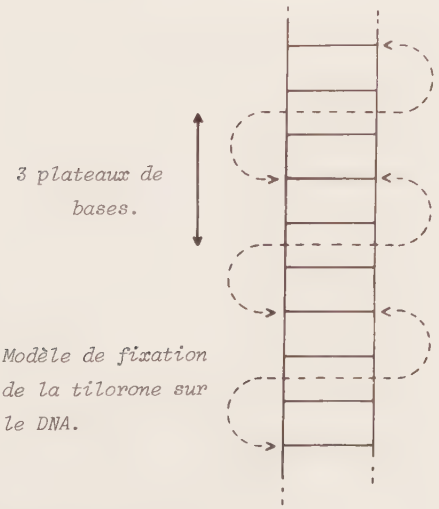


Figure III,24 : Modèle de fixation de la tilorone sur le DNA.

distants de 3 plateaux de bases, avec possibilité d'intercalation entre les deux plateaux intermédiaires. La figure III,24 donne une vue schématique de ce modèle.

D. CONCLUSION.

Les résultats exposés dans ce chapitre confirment l'intercalation de la tilorone entre les plateaux de bases du DNA, et montrent que cette étape est tributaire de l'état dynamique global de la chaîne bicaténaire. La fixation du colorant se ferait donc de manière non spécifique, et seule la dynamique du DNA dépendrait de la proportion de paires A-T et G-C.

D'autre part, ils nous permettent de proposer deux mécanismes réactionnels entre lesquels la cinétique ne peut trancher. D'autres études à l'équilibre, par RMN en particulier, sont nécessaires à ce stade pour pouvoir arriver à proposer un modèle complet.

Enfin, l'hypothèse d'un site très spécifique envisagée lors de la détermination de l'isotherme de fixation sur le DNA n'a pu être ni confirmée, ni infirmée, la cinétique n'étant probablement pas assez sensible à un tel équilibre. L'existence éventuelle de ce site spécifique devra donc être vérifiée par des méthodes statiques, car elle pourrait être directement liée au rôle biologique de reconnaissance de l'initiateur de la production d'interféron.

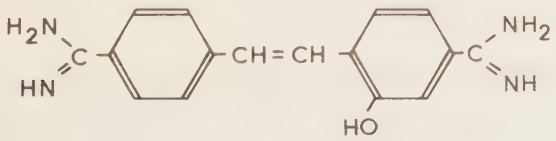
****

CHAPITRE IV

ETUDE CINETIQUE DE L'INTERACTION DE L'HYDROXYSTILBAMIDINE AVEC LE DNA

La 2-hydroxy-4,4'-stilbène dicarboxamidine,ou hydroxystilbamidine (OHSA) est un colorant mutagène et trypanocide[53,54], se fixant sur le DNA sans s'intercaler entre les paires de bases[55]. Une étude exhaustive de l'interaction de l'OHSA avec les acides nucléiques a été effectuée par FESTY[55]. Nous rapportons ici quelques résultats essentiels de son travail (§ IV,1). Nous avons essayé de préciser le modèle de fixation qu'il a proposé en effectuant une étude cinétique par saut de température de l'interaction OHSA - DNA et polynucléotides.

Après un paragraphe où nous exposons les autres résultats obtenus (§ IV,2), nous présentons cette étude sous forme de manuscrit soumis à publication dans Biochimica Biophysica Acta (§ IV,3).



2 SO_3H-CH-CH_2OH

HYDROXYSTILBAMIDINE (OHSA) diiséthionate

IV. 1. Caractères de l'association de l'OHSA avec le DNA.

A. Propriétés spectrales :

L'OHSA, à pH = 5, possède un spectre d'absorption dont le maximum se situe à 345 nm ; une deuxième transition, plus faible, donne lieu à un épaulement vers 315 nm. La formation du complexe avec les acides nucléiques se traduit par un effet bathochrome : le spectre présente alors un maximum d'absorption vers 360 nm (figure IV,1).

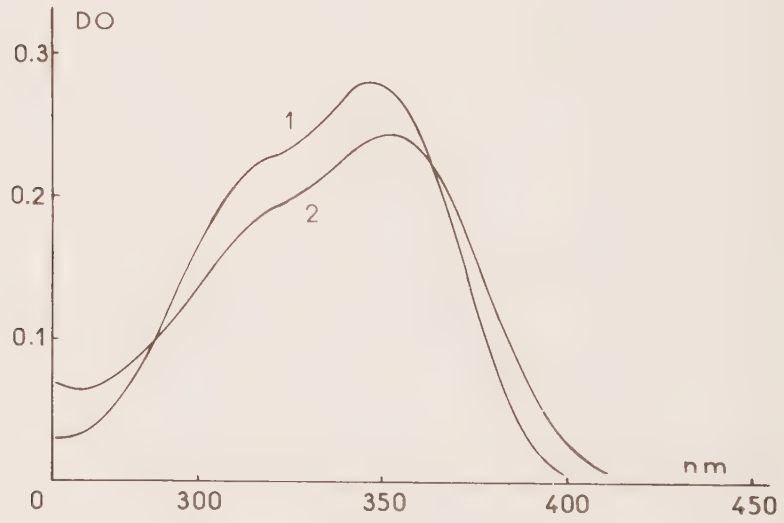


Figure IV,1 : Spectres d'absorption comparés de l'OHSA libre (1) , et complexée au DNA (2), à pH = 5.

Le spectre de fluorescence de l'OHSA a la particularité remarquable de posséder deux bandes d'émission situées dans le bleu et dans le rouge ; l'origine de la bande "rouge" est mal connue, et il est difficile d'examiner à partir de la polarisation de fluorescence l'angle que fait le moment de transition de la forme rouge avec le

moment d'absorption, car l'importance relative des fluorescences bleue et rouge dépend de la nature du solvant : en effet, au fur et à mesure que la viscosité du solvant croît, la fluorescence rouge tend à disparaître.

Deux hypothèses ont été émises pour expliquer l'origine de l'état excité rouge :

a) une isomérisation de la molécule vers un état plus conjugué à noyaux coplanaires, donc donnant lieu à une absorption et à une fluorescence déplacées vers les grandes longueurs d'onde. En effet, les noyaux aromatiques de l'OHSA à l'état fondamental forment un angle de 12° entre eux[56].

b) Une perturbation au niveau du groupe OH pouvant aller jusqu'à son ionisation.

Dans les deux cas, il faut supposer que l'état excité "rouge" se peuple aux dépens de l'état excité bleu. Les temps de vie sont malheureusement trop courts pour une étude directe.

Lors de la fixation du colorant sur le DNA, il est vraisemblable que l'on puisse trouver certains sites où apparaît une "viscosité locale" très forte qui empêche une réorganisation à l'état excité. On peut également envisager que ce blocage est dû à la formation d'une liaison hydrogène qui empêche à la fois toute isomérisation géométrique et toute ionisation du groupe OH. D'où l'hypothèse que les fluorescences bleue et rouge du complexe DNA-OHSA sont dues, non à deux états successifs dans le temps d'un même type de complexe, mais à deux types de complexation dont l'un ne donnerait que la fluorescence bleue et l'autre les fluorescences bleue et rouge.

B. Principales propriétés de l'association DNA-OHSA.

a) L'étude de la fluorescence de l'OHSA, fixée sur divers polydésoxyribonucléotides différant par leur composition en bases, a montré[55] que l'augmentation de fluorescence bleue est une fonction linéaire du carré de la teneur en paires (A-T) alors que la fluorescence rouge dépend peu de cette proportion de A-T. Le complexe avec le poly(dG)-poly(dC) a un comportement particulier et fluoresce dans le vert.

b) Les courbes de relargage thermique du colorant en absorption et en fluorescence montrent nettement la libération de l'OHSA complexée à la température de fusion du DNA, indiquant la nécessité d'une structure bicaténaire pour sa fixation. En fluorescence rouge

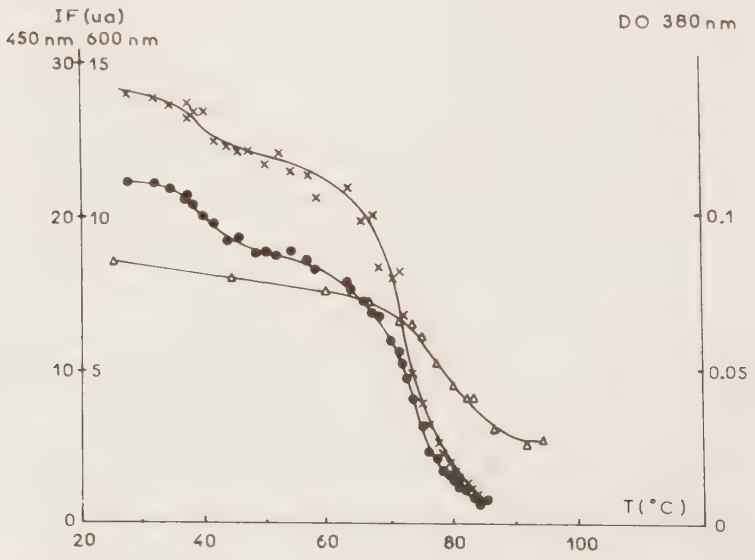


Figure IV,2 : Courbes de relargage thermique de l'OHSA fixée sur le DNA :

Δ D.O. 380 nm ; (●) fluorescence 600 nm ; (x) fluorescence 450 nm.

et bleue, elles présentent de plus, entre 35° et 45°C, un accident qu'on peut interpréter en utilisant le concept de pré-fusion du DNA (figure IV,2) [55].

c) L'étude stoechiométrique de l'association OHSA-DNA, effectuée par absorption UV [55], a montré l'existence de deux sites indépendants de fixation (S_1 et S_2). La figure IV,3 donne l'isotherme de Scatchard pour le DNA de thymus de veau en force ionique μ = 0,15, pH = 5 et 10°C interpolée à partir des isothermes à 5°C et 25°C déterminées par FESTY [55].

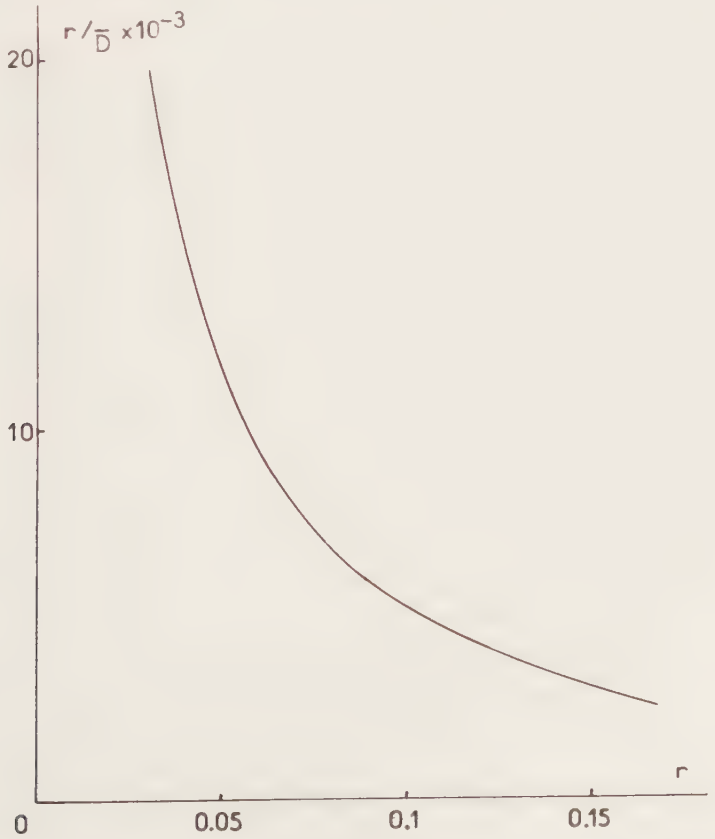


Figure IV,3 : Isotherme de fixation de l'OHSA sur le DNA T.V. μ = 0,15 ,

Dans ces conditions, les valeurs des paramètres thermodynamiques sont:

$K_1 = 570.000\ M^{-1}$	$K_2 = 14.800\ M^{-1}$
$n_1 = 0,055$	$n_2 = 0,195$
$\Delta H_1 = -1,4$ kcal/mole	$\Delta H_2 = -1,7$ kcal/mole
$\Delta S_1 = 21$ u.e. par nucléotide	$\Delta S_2 = 13,7$ u.e. par nucléotide

Les isothermes de Scatchard obtenues par fluorométrie sont linéaires et les valeurs des constantes d'équilibre qui leur sont associées correspondent au site 1. On trouve un nombre de sites "bleus" plus petit que le nombre de sites "rouges".
Le site 1 est caractérisé par une fixation sur le DNA au moyen de 1,5 charges, alors que le site 2 ne fait intervenir qu'une charge, comme le montre l'influence de la force ionique sur l'association[55].

C. Modèle proposé par FESTY[55].

Compte tenu de l'encombrement de la molécule d'OHSA (13 Å entre les groupes amidines), FESTY suppose qu'elle établit avec les phosphates des liaisons intercaténaires au travers des deux sillons du DNA sans que ces deux loci soient assimilables aux sites S_1 et S_2. Dans le grand sillon, trois positions sont possibles pour lesquelles l'axe longitudinal est plus ou moins incliné par rapport à l'axe de la double hélice. Toutes ces positions laissent une possibilité de mouvements internes à la molécule d'OHSA.
Dans le petit sillon, on peut retenir deux positions pour le colorant : l'une où l'axe de ce dernier serait quasi-parallèle à celui du DNA, et l'autre où les plans moyens des cycles aromatiques sont presque parallèles aux plans des bases. La reconnaissance des paires A-T est

alors possible si l'on postule l'établissement d'une liaison hydrogène entre OH phénolique du colorant et l'un des sites accepteur de proton de la paire A-T, comme par exemple l'oxygène-2 de la thymine.

Pour préciser ce modèle, nous avons entrepris des expériences d'orientation du DNA par le champ électrique en mesurant le dichroïsme électrique et la variation des composantes de la polarisation de fluorescence. Ces résultats font l'objet du prochain paragraphe.

IV. 2. Etude par polarisation de fluorescence en champ électrique du complexe OHSA - DNA.

Dans le modèle proposé par FESTY, cinq positions différentes de l'OHSA par rapport à l'axe du DNA conviennent pour que le colorant établisse un pont intercaténaire. L'étude de la géométrie du complexe peut alors être entreprise à l'aide du dichroïsme linéaire lorsque la macromolécule est orientable (en film, en champ hydrodynamique ou électrique). C'est le cas pour le DNA. Cependant, l'existence de deux sites de fixation pour l'OHSA complique singulièrement le problème.

Les caractéristiques de fluorescence sont beaucoup plus sensibles à l'effet de l'environnement et, dans le cas de l'OHSA, seul le site fort (S_1) exalte la fluorescence du colorant. De plus, l'étude de la fluorescence en champ électrique fournit quatre informations expérimentales correspondant aux variations des quatre composantes polarisées, et ceci pour chaque bande de fluorescence. WEILL et HORNICK[57] ont calculé, pour un modèle particulier de complexe,la variation des composantes de la polarisation de fluorescence lorsqu'on applique un champ électrique; ils ont ainsi déterminé la polarisabilité du DNA par l'étude du complexe DNA - acridine orange où l'on sait que le colorant s'intercale perpendiculairement à l'axe de la double hélice.

Pour ce travail, WEILL a généralisé le calcul à un colorant fixé de façon quelconque à une macromolécule rigide; nous l'avons appliqué à l'étude du complexe du DNA avec l'OHSA.

A. Variation des composantes polarisées de fluorescence en champ électrique.

Soit Oxyz un système d'axes de référence où Ox est la direction de propagation de la lumière incidente, Oy la direction d'observation de la fluorescence et Oz la direction de polarisation "verticale" de la lumière.

Les composantes polarisées de fluorescence sont définies classiquement par V_V, V_H, H_V et H_H où la lettre principale représente la direction verticale (V) ou horizontale (H) de polarisation de l'analyseur et où l'indice correspond à celle du polariseur.

On attache à la macromolécule un repère Ouvw où Ow est confondu avec l'axe susceptible de s'orienter (direction du moment dipolaire résultant ou axe de plus grande polarisabilité pour une orientation en champ électrique). On pose $\theta = (Ow,Oz)$. La position du moment d'absorption μ_a du chromophore est donnée par l'angle χ avec Ow, et l'axe Ou est choisi dans le plan (μ_a,Ow). La position du moment d'émission μ_e est repérée dans le même trièdre par les angles χ' et ψ.

Les coefficients d'absorption molaire en lumière polarisée et les composantes polarisées de la fluorescence s'expriment en fonction des valeurs moyennes des carrés des composantes de μ_a et μ_e par :

$$\left\{\begin{array}{l} \varepsilon_{/\!/} = K \langle \mu_{az}^2 \rangle \\ \varepsilon_{\perp} = K \langle \mu_{ay}^2 \rangle \\ V_V = K' \langle \mu_{az}^2 \mu_{ez}^2 \rangle \\ H_V = K' \langle \mu_{az}^2 \mu_{ex}^2 \rangle \\ V_H = K' \langle \mu_{ay}^2 \mu_{ez}^2 \rangle \\ H_H = K' \langle \mu_{ay}^2 \mu_{ex}^2 \rangle \end{array}\right.$$

où K et K' sont des facteurs de proportionnalité.

Tableau IV, 1

B_i \ A_j	$\sin^2\chi\sin^2\chi'$	$\sin^2\chi\cos^2\chi'$	$\cos^2\chi\sin^2\chi'$	$\cos^2\chi\cos^2\chi'$	$\sin\chi\cos\chi\sin\chi'\cos\chi'$
V_V	$\frac{1}{8}\overline{\sin^4\theta}(1+2\cos^2\psi)$	$\frac{1}{2}(\overline{\sin^2\theta}-\overline{\sin^4\theta})$	$\frac{1}{2}(\overline{\sin^2\theta} - \overline{\sin^4\theta})$	$1 - 2\overline{\sin^2\theta} + \overline{\sin^4\theta}$	$2\cos\psi(\overline{\sin^2\theta}-\overline{\sin^4\theta})$
H_V	$\frac{1}{4}\overline{\sin^2\theta}-\frac{1}{16}\overline{\sin^4\theta}(1+2\cos^2\psi)$	$\frac{1}{4}\overline{\sin^4\theta}$	$\frac{1}{2} - \frac{3}{4}\overline{\sin^2\theta} + \frac{1}{4}\overline{\sin^4\theta}$	$\frac{1}{2}(\overline{\sin^2\theta} - \overline{\sin^4\theta})$	$-\cos\psi(\overline{\sin^2\theta}-\overline{\sin^4\theta})$
V_H	$\frac{1}{4}\overline{\sin^2\theta}-\frac{1}{16}\overline{\sin^4\theta}(1+2\cos^2\psi)$	$\frac{1}{2} - \frac{3}{4}\overline{\sin^2\theta} + \frac{1}{4}\overline{\sin^4\theta}$	$\frac{1}{4}\overline{\sin^4\theta}$	$\frac{1}{2}(\overline{\sin^2\theta} - \overline{\sin^4\theta})$	$-\cos\psi(\overline{\sin^2\theta}-\overline{\sin^4\theta})$
H_H	$\frac{1}{64}(24 - 24\overline{\sin^2\theta} + \overline{\sin^4\theta}) - \frac{1}{64}\cos^2\psi(-16 +16\overline{\sin^2\theta}+2\overline{\sin^4\theta})$	$\frac{1}{64}(16\overline{\sin^2\theta} - 4\overline{\sin^4\theta})$	$\frac{1}{64}(16\overline{\sin^2\theta} - 4\overline{\sin^4\theta})$	$\frac{8}{64}\overline{\sin^4\theta}$	$-\frac{16}{64}\cos\psi\overline{\sin^4\theta}$

Valeurs des composantes polarisées de fluorescence dans un champ d'orientation: $B_i = K'\mu_a^2\mu_e^2\sum_j a_{ij}A_j$

Ces expressions conduisent, après de longs calculs, et en moyennant sur les rotations autour de Ow et Oz, aux expressions suivantes qui ne contiennent plus que les angles χ, χ', ψ et les moyennes sur $\sin^2\theta$ et $\sin^4\theta$:

- Dichroïsme :

$$\begin{cases} \dfrac{\varepsilon_{//}}{\varepsilon} = \dfrac{\langle \mu_{az}^2 \rangle}{\mu_a^2/3} = 3\left[\cos^2\chi - \langle\sin^2\theta\rangle\left(\dfrac{3\cos^2\chi - 1}{2}\right)\right] \\ \dfrac{\varepsilon_{\perp}}{\varepsilon} = \dfrac{\langle \mu_{ay}^2 \rangle}{\mu_a^2/3} = 3\left[\dfrac{1}{2}\sin^2\chi + \dfrac{1}{2}\langle\sin^2\theta\rangle\left(\dfrac{3\cos^2\chi - 1}{2}\right)\right] \end{cases} \qquad \text{(IV,2,1)}$$

- Fluorescence : voir Tableau IV,1 .

- Anisotropie de fluorescence :

$$r_{fl} = \frac{V_V - H_V}{V_V + 2H_V} = \frac{3\cos^2(\chi'-\chi) - 1}{5}$$

$$= (3\cos^2\psi - 1)\sin^2\chi\sin^2\chi' - \sin^2\chi\cos^2\chi' - \cos^2\chi\sin^2\chi' + 2\cos^2\chi\cos^2\chi' + 6\cos\psi\cos\chi\sin\chi\cos\chi'\sin\chi' \qquad \text{(IV,2,2)}$$

On notera qu'en présence d'un champ d'orientation ($\langle\sin^2\theta\rangle \neq \frac{2}{3}$), les composantes H_V et V_H ne restent identiques que si $\chi = \chi'$.
En effet :

$$\boxed{H_V - V_H = K'\mu_a^2\,\mu_e^2\,(3/4\langle\sin^2\theta\rangle - 1/2)\,(\cos^2\chi - \cos^2\chi')} \qquad \text{(IV,2,3)}$$

On dispose ainsi d'un test sensible à l'orientation relative des moments d'absorption et d'émission.

Tableau IV, 2

B_i \ A_j	$\sin^2\chi \sin^2\chi'$	$\sin^2\chi\cos^2\chi'$	$\cos^2\chi \sin^2\chi'$	$\cos^2\chi \cos^2\chi'$	$\sin\chi\cos\chi\sin\chi'\cos\chi'$
$\frac{105}{AE^2}\frac{\Delta V_V}{V_V + 2H_V}$	$-2(1 + 2\cos^2\psi)$	1	1	12	$4\cos\psi$
$\frac{105}{AE^2}\frac{\Delta H_V}{V_V + 2H_V}$	$-\frac{5 - 4\cos^2\psi}{2}$	-4	$\frac{13}{2}$	1	$-2\cos\psi$
$\frac{105}{AE^2}\frac{\Delta V_H}{V_V + 2H_V}$	$-\frac{5 - 4\cos^2\psi}{2}$	$\frac{13}{2}$	-4	1	$-2\cos\psi$
$\frac{105}{AE^2}\frac{\Delta H_H}{V_V + 2H_V}$	$5 - 4\cos^2\psi$	$-\frac{5}{2}$	$-\frac{5}{2}$	-2	$4\cos\psi$

Expressions de la variation des composantes polarisées en champ électrique, normées par rapport à $(\Delta V_V + 2H_V)AE^2/105$: $B_i = \sum_j \alpha_{ij} A_j$

Un champ électrique dirigé suivant l'axe Oz modifie la distribution des molécules orientées initialement au hasard. Pour de petites orientations en champ électrique correspondant à une variation des phénomènes en E^2 , on a alors[58] :

$$\begin{cases} \langle \sin^2\theta \rangle = \frac{2}{3} - \frac{2}{45} A E^2 \\ \langle \sin^4\theta \rangle = \frac{8}{15} - \frac{16}{315} A E^2 \end{cases} \qquad \text{(IV,2,4)}$$

$$\text{avec } A = \frac{\alpha_o - \beta_o}{kT} + \frac{\mu^2}{k^2T^2}$$

où μ *est le moment dipolaire permanent*
$\alpha_o - \beta_o$ *la différence entre les polarisabilités longitudinales et transverses et* E *le champ électrique appliqué.*

On vérifie en dichroïsme que :

$$\frac{\Delta\varepsilon_{/\!/}}{\varepsilon} = -2\frac{\Delta\varepsilon_{\perp}}{\varepsilon} = \frac{1}{15}(1 - 3\cos^2\chi) A E^2$$

En normant les valeurs de ΔV_V , ΔV_H , ΔH_V et ΔH_H par rapport à $(V_V + 2H_V)AE^2/105$, on obtient les variations des composantes polarisées de fluorescence consignées dans le tableau IV,2.

On dispose donc, en principe, de six grandeurs mesurables ($\frac{\Delta I_{/\!/}}{I}$, r_{fl} , $\frac{\Delta V_V}{V_V}$, $\frac{\Delta V_H}{V_H}$, $\frac{\Delta H_V}{H_V}$ et $\frac{\Delta H_H}{H_H}$) pour déterminer quatre paramètres (χ, χ' , ψ et AE^2).

B. Appareillage :

1) La mesure du dichroïsme linéaire et des composantes polarisées de fluorescence exige un spectrophotomètre rapide et très lumineux. L'application prolongée d'un champ électrique important à une solution de faible volume créerait en effet une forte élévation de température par effet Joule et on atteindrait vite l'ébullition. D'autre part, l'électrolyse de la solution rendrait rapidement la solution inutilisable.

On peut donc songer à se servir de l'appareil de saut de température pour de telles expériences en travaillant avec des forces ioniques faibles (jusqu'à $\mu = 10^{-2}$) : l'utilisation de champs électriques de plusieurs kV par cm durant quelques dizaines de microsecondes donne ainsi lieu à un phénomène d'orientation transitoire facilement décelable par mesure du dichroïsme électrique; la théorie de ce phénomène a été traitée[59]. Il faut cependant s'assurer que la saut de température provoqué ne soit pas générateur de relaxations qui perturbent la mesure.

Dans le cas de la mesure des composantes polarisées de fluorescence, cette méthode n'est plus applicable, car les variations de rendement quantique avec la température sont généralement trop élevées pour permettre une exploitation correcte des résultats.

Nous avons donc seulement utilisé la partie spectrophotomètre de l'appareil de saut de température décrite au chapitre II (figure II, 4), en absorption pour la mesure du dichroïsme électrique, et en "fluorescence" pour la mesure des composantes polarisées de fluorescence (en adjoignant le polariseur P et l'analyseur A_1).

La cellule de mesure est remplacée par une cuve de spectrofluorimétrie de 1 cm de parcours optique dans laquelle sont placées 2 électrodes carrées horizontales en acier inoxydable distantes de 1,7 mm. Un générateur d'impulsions carrées et un amplificateur donnant une tension de 500 V fournissent le champ électrique qui est appliqué verticalement. La figure IV,4 donne une vue schématique de la géométrie de l'ensemble cuve-électrode.

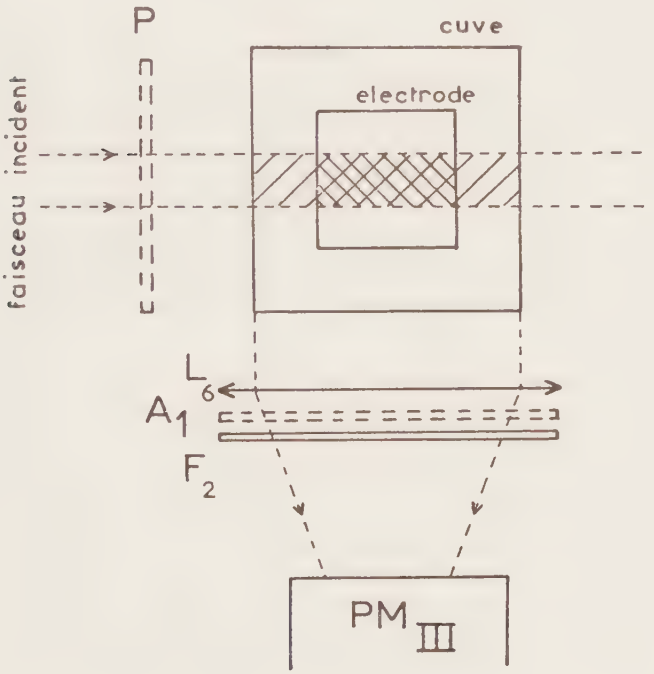


Figure IV,4 : Schéma donnant la géométrie de l'ensemble cuve-électrode utilisé pour les expériences de fluorescence en champ électrique.

: volume total observé ;

: volume observé soumis au champ électrique.

On peut remarquer en particulier que la totalité de la lumière fluorescée vue par le photomultiplicateur n'est pas soumise au champ électrique. De même, pour les mesures en dichroïsme, seule une partie du parcours optique est soumise au champ électrique. Ceci n'est pas gênant pour l'interprétation des résultats dans la mesure où l'on peut déterminer un facteur AE^2 moyen pour les relations (IV,2,4) ; cette détermination est effectuée avec un colorant dont on connait l'orientation par rapport à l'axe du DNA.

Pour cela, nous avons mesuré dans ce travail les quantités $\Delta V_V/V_V$ et $\Delta I_{/\!/}/I$ pour le complexe DNA-acridine orange et utilisé les formules pour $\chi = 90°$ déjà données par WEILL et HORNICK[57].

2) Les polarisations de fluorescence ont été mesurées sur un spectrofluorimètre équipé d'un analyseur tournant permettant la mesure précise de V_V-H_V et de V_V+H_V par détection de phase[61].

C. Méthode et résultats :

Dans la série de mesures que nous avons entreprises, nous avons :

1) préparé par sonication un DNA sous forme de bâtonnets dont la longueur a été déterminée à partir de la relaxation du dichroïsme électrique : en effet, $\Delta\varepsilon_{/\!/}$ est proportionnel à $\langle \sin^2\theta \rangle$ et relaxe donc comme e^{-6Dt}, où D est la constante de diffusion de rotation du bâtonnet autour d'un petit axe.
2) étudié le dichroïsme électrique, la densité optique et la variation de la composante V_V de la fluorescence du complexe DNA-acridine orange ($\chi = 90°$). On en déduit directement AE^2

par les relations suivantes :

$$\frac{\Delta I}{I} = \frac{\Delta \varepsilon_{/\!/}}{\varepsilon} \ln \frac{I_o}{I}$$

$$= (1 - \cos^2 \chi) \frac{2,3}{15} (D.O.) AE^2$$

$$= \frac{2,3}{15} (D.O.) AE^2$$

et $$\frac{\Delta V_V}{V_V} = - \frac{2}{21} AE^2$$

3) mesuré l'anisotropie de fluorescence r_{fl} du complexe OHSA-DNA dans le bleu et dans le rouge.

4) mesuré le dichroïsme électrique et la densité optique du complexe OHSA-DNA. Par comparaison avec l'acridine orange, nous obtenons une valeur moyenne χ des molécules d'OHSA fixées vues en absorption.

5) mesuré les variations relatives des composantes polarisées des deux bandes de fluorescence en champ électrique ; les résultats ont été corrigés du dichroïsme dû à l'effet d'écran provenant de la géométrie de l'ensemble cuve-électrode.

- On passe des résultats expérimentaux aux composantes normées correspondant au tableau IV,2 en multipliant $\Delta V_V/V_V$ par $\frac{105}{AE^2}\left(\frac{1 + 2r_{fl}}{3}\right)$ et les trois autres rapports par $\frac{105}{AE^2}\left(\frac{1 - r_{fl}}{3}\right)$

- On s'assure de la cohérence des différences $\Delta H_V - \Delta V_H$, $\Delta H_H + 2\Delta H_V$ et $-(\Delta H_H + 2\Delta V_H)$; on en déduit une valeur de χ' dans le bleu et dans le rouge.

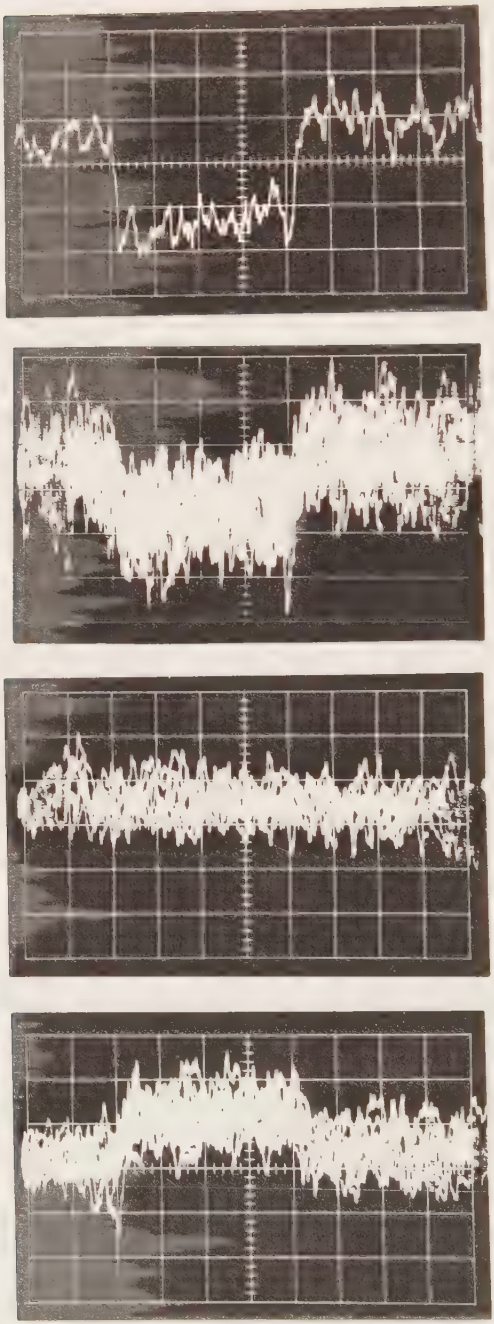


Figure IV,6 : Variation des composantes polarisées de fluorescence rouge en champ électrique pour le complexe DNA-OHSA : 10^{-3} M NaCl, λ_{exc} = 365 nm, λ_{em} > 530 nm. Echelle verticale : 50 mV/cm pour 10 V de signal. Echelle horizontale : 200 µs/cm . Le champ électrique est appliqué aux temps 400 µs à 1200 µs. Pour ΔH_V, ΔV_H et ΔH_H , les clichés donnent une superposition de plusieurs signaux. L'axe des intensités de fluorescence est dirigé vers le bas.

- On introduit les valeurs de χ et de χ' ainsi déterminées dans l'expression de r_{fl} (IV,2,2) ; on obtient alors une valeur de ψ. On recalcule les composantes pour différentes valeurs de χ jusqu'à trouver un bon accord avec l'expérience.

Les conditions expérimentales ont été les suivantes (acridine orange et OHSA) :

- concentration du DNA : D.O. = 5
- taux de fixation : D/P = 0,04
- 10^{-3} *M* NaCl
- température ordinaire ;

Pour le complexe acridine orange-DNA :

λ_{exc} = 334 nm et $\lambda_{ém}$ > 460 nm

ou encore

λ_{exc} = 546 nm et $\lambda_{ém}$ = 610 nm

Pour le complexe OHSA-DNA :

λ_{exc} = 365 nm 400 nm < $\lambda_{ém}$ < 520 nm pour la bande bleue

$\lambda_{ém}$ > 530 nm pour la bande rouge.

Les valeurs de l'anisotropie de fluorescence de l'OHSA sont alors :

r_{fl}^{bleu} = 0,334 r_{fl}^{rouge} = 0,286

(mesures effectuées par J.P. BENTZ).

La figure IV,5 donne un exemple de résultats obtenus dans la mesure de la variation des composantes polarisées de fluorescence rouge du complexe OHSA-DNA.

La procédure que nous venons d'exposer aboutit alors aux valeurs des angles suivantes :

Dichroïsme électrique : $\cos^2 \chi = 0,35$ soit $\chi = 53°$

Polarisation de fluorescence bleue :

$$\begin{cases} \cos^2 \chi = 0,47 & \text{soit} \quad \chi = 47° \\ \cos^2 \chi' = 0,45 & \text{soit} \quad \chi' = 48° \\ \cos^2 \psi = 0,80 & \text{soit} \quad \psi = 26° \end{cases}$$

Polarisation de fluorescence rouge :

$$\begin{cases} \cos^2 \chi = 0,45 & \text{soit} \quad \chi = 48° \\ \cos^2 \chi' = 0,40 & \text{soit} \quad \chi' = 51° \\ \cos^2 \psi = 0,69 & \text{soit} \quad \psi = 34° \end{cases}$$

Le tableau IV,3 permet de comparer les variations expérimentales et calculées en utilisant ces valeurs d'angle.

	$\alpha\Delta V_V$	$\alpha\Delta H_V$	$\alpha\Delta V_H$	$\alpha\Delta H_H$
$(bleu)_{exp}$	2,27 ± 0,4	0,35 ± 0,15	0,15 ± 0,15	-0,31 ± 0,15
$(bleu)_{calc}$	2,42	0,23	0,34	-0,26
$(rouge)_{exp}$	1,79 ± 0,3	0,52 ± 0,15	0,02 ± 0,15	-0,41 ± 0,15
$(rouge)_{calc}$	1,87	0,21	-0,26	-0,32

Tableau IV,3 . $\alpha = \dfrac{105}{AE^2 (V_V + 2V_H)}$

D. Discussion.

Les valeurs de γ obtenues par dichroïsme électrique et par polarisation de fluorescence en champ électrique ne sont pas identiques. Ceci peut s'expliquer si l'on considère :

- qu'une partie des sites de fixation correspond à des molécules à faible rendement quantique de fluorescence (S_2 par exemple)

et / ou

- qu'il existe plusieurs sites de fixation avec des fluorescences notables, mais les moyennes différentes entrainent que les résultats d'absorption et de fluorescence ne sont pas les mêmes lorsqu'on les interprète avec un seul site.

Les résultats de stoechiométrie montrent que seul le "site fort" S_1 est visible en fluorescence ; la valeur de χ obtenue par fluorescence (47°) correspondrait donc à l'orientation moyenne du site S_1.
On peut affirmer d'autre part que si deux sites existent en fluorescence, ils ne correspondent pas l'un exclusivement à la fluorescence bleue, l'autre exclusivement à la fluorescence rouge, les valeurs de χ obtenues dans les deux bandes de fluorescence étant égales aux erreurs d'expérience près.
De même que pour la molécule isolée, les valeurs de r_{fl}, donc de $\chi' - \chi$ et de ψ pour les fluorescences bleue et rouge, suggèrent que la fluorescence rouge a un temps de vie plus long que la fluorescence bleue. En effet la désorientation du moment d'émission par rapport au moment d'absorption est entièrement due au mouvement brownien de l'OHSA. Ce fait a été vérifié par des mesures d'inhibition de fluorescence sur l'OHSA en solution (J.P.BENTZ) qui n'indiquent aucune différence pour les anisotropies fondamentales associées

aux deux bandes de fluorescence.

Cette étude a donc permis de déterminer de façon précise la position de la molécule d'OHSA fixée sur le site fort S_1 du DNA. Les résultats obtenus excluent formellement l'intercalation du colorant entre les paires de bases. Ils donnent également des renseignements précieux pour une explication ultérieure de l'origine de ses deux fluorescences. D'autre part, la technique utilisée et le montage expérimental essayé ont pleinement répondu à nos voeux et s'avèrent plein d'intérêt pour d'autres études similaires. Nous envisageons donc d'optimiser ce montage (ensemble cuve-électrode en particulier) pour le rendre plus performant et plus facile d'utilisation.

IV. 3. Etude cinétique par saut de température de l'interaction OHSA - DNA

Cette étude, qui constitue la majeure partie de notre travail sur l'OHSA, fait l'objet d'un manuscrit soumis pour publication à Biochimica Biophysica Acta. Nous le présentons dans les pages qui suivent.

INTERACTION BETWEEN HYDROXYSTILBAMIDINE AND DNA II. TEMPERATURE JUMP RELAXATION STUDY. DYNAMICS OF NUCLEIC ACIDS AND POLYNUCLEOTIDES

J. STURM and R. ZANA

Centre de Recherches sur les Macromolécules

C.N.R.S.

67083 STRASBOURG-CEDEX

and M. DAUNE

Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire

15, rue Descartes, 67000 STRASBOURG

SUMMARY

A T-jump relaxation study of the interaction of hydroxystilbamidine with DNA and synthetic polynucleotides has been performed. Two concentration dependent relaxation times τ_1 and τ_2 have been observed in the submillisecond range when detecting relaxation effects by means of light absorption. The longer of these two times (τ_1) is also observed when using "blue" or "red" fluorescence detection. In the longer time scale the "red" fluorescence shows no other relaxation but the blue fluorescence shows two additional relaxation processes (τ_3 and τ_4) which correspond to an increase of fluorescence and which are independent of concentration.

The experimental results clearly indicate that τ_1 and τ_2 are associated with the binding of the dye to strong and weak binding sites, respectively. A kinetic model is given to explain the results. It allows the determination of the four rate constants for the two binding reactions and yields equilibrium association constants in good agreement with those obtained from stoichiometric studies.

The study of the effect of temperature, nature of the polymer, ionic strength and fraction of bound dye on τ_3 and τ_4 indicates that the dye acts only as a "blue" fluorescence probe of some processes involving the DNA or polynucleotide alone. These processes appear to be related with the dynamic structure of the polymers.

I. INTRODUCTION

From a recent qualitative study [1], it was inferred that hydroxystilbamidine (OHSA) does not intercalate into DNA and that it shows specificity toward (A-T) pairs. The stoichiometry and thermodynamics of the binding of OHSA by DNA have been reported in the preceding paper [2]. The binding isotherms have been interpreted in terms of two independent types of binding sites. The number of strong binding sites increases with the (A-T) pair content of DNA. On the other hand, binding isotherms determined from fluorescence measurements are linear and appear to correspond to strong binding sites.

The purpose of the present paper is to report the results of a temperature-jump study of the kinetics of the interaction of OHSA with DNA and polynucleotides. This study has permitted us to confirm the validity of the assumption of two independent binding sites. In addition T-jump data obtained by means of a fluorescence readout indicate that hydroxystilbamidine can be used to probe the dynamics of the secondary structure of nucleic acids.

II. MATERIALS

DNA and polynucleotides. The DNA samples used in this study were extracted from calf thymus according to classical procedures. Prior to T-jump studies the samples were sonicated for about 4 minutes at 20 kHz in order to reduce the molecular weight to about 5.10^5. Poly [d(A-T)] and poly (dG)-poly(dC)

were purchased from Miles Chemical (Elkhart, Ind.). The ratio (G)/[(C) + (G)] of the poly (dG) - Poly (dC) sample was 0.48 according to the manufacturer. Poly (dA) - poly (dT), purchased from P.L. Biochemicals (Milwaukee, Wisconsin), was prepared by the manufacturer from an equimolecular mixture of poly (dA) and poly (dT).

Hydroxystilbamidine. This compound was obtained from May and Baker.
The raw product has been shown to contain two impurities [1]. These contaminants did not appear, however, to have any influence on T-jump experiments. Indeed relaxation measurements with the fluorescence detection (see Methods), i.e., the physical property which should be the most sensitive to impurities, yielded identical results when using the commercial product and the one purified by chromatography on Sephadex G 15. The commercial compound was therefore used throughout this work without further purification.

Berenil and Stilbamidine. The samples used in this work were donated to us by Dr Festy.

III. METHODS

1. T-jump apparatus. A double beam T-jump apparatus using a Joule heating and a detection by means of either UV or visible light absorption, or fluorescence, was built as part of this work. The heating circuit (high voltage dc power supply, spark gap and condensors) and the T-jump cells were purchased from Messanlagen Studiengesellschaft (Göttingen, W-Germany).

A 200 W Hg-Xe lamp (Hanovia, type 901 B-1), driven by a Metronic 102 CC (Göttingen, W-Germany) highly stabilized dc power supply, was used as light source in the UV range. A 150 W tungsten-iodine lamp was used when this work was started, at wavelength near 400 nm.

The beam from the lamp was passed through a Bausch and Lomb grating monochromator and was divided by a beam-splitter (1 mm thick quartz plate). About 85% of the incident beam was sent through the T-jump cell to a "measuring" photomultiplier (150 UVP type from Radiotechnique, France). The remaining 15% reached a "reference" photomultiplier, identical to the "measuring" one. The electrical signals from the photomultipliers were fed to a photometric control unit very similar to that built by Rigler, Rabl and Jovin [3]. The purpose of this unit is :

1) to amplify and take the difference between the two signals in order to eliminate fluctuations and drifts due to the light source.

2) to start the sweep of the oscilloscope at a zero value of the voltage and with an adjustable delay time with respect to the start of the T-jump. This last feature permits one to eliminate transients occurring in the few first microseconds which follow the discharge of the capacitor through the cell and caused by spurious effects such as cavitation, electroluminescence, etc. It also permits the measurement of a slow relaxation time of small amplitude in the presence of a fast relaxation time of large amplitude.

The apparatus also permitted the detection of relaxation effects

by means of fluorescence measurements. For this purpose the fluorescence light was collected in the cell at right angle from the incident beam using a conical lens window and sent on a photomultiplier type 9558 QA manufactured by EMI (Great Britain). The measurements were performed on the "blue" or the "red" fluorescence bands of the bound OHSA using a "blue" (below 520 nm) or a "red" (above 530 nm) filter. Another cut-off filter eliminated the UV light below 400 nm. The wavelength of the excitation light was 365 nm.

The relaxation signals from the photometric control unit were displayed on the screen of a Tektronix Model 549 storage oscilloscope and recorded on a 24 x 36 mm film.

Most of the relaxation measurements were performed at ionic strength 0.15 (0.13 M $NaNO_3$ + 0.02 M acetate buffer) and pH = 5. In these conditions a heating time of 1 to 6 μsec, depending on the capacity of the condenser, could be achieved. The concentrations of DNA and polynucleotides were determined by spectrophotometry. The concentrations of bound and free dye were obtained from the Scatchard plots reported in the preceding paper [2].

2. Analysis of relaxation curves. An apparatus was built to synthetize curves obeying the equation :

$$F(t) = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2)$$

A_1, A_2, τ_1 and τ_2 could be varied independently by means of potentiometers. Another feature of the apparatus permitted us to simulate the effect of a finite heating time on the relaxation curves. The simulated curve was displayed on the screen

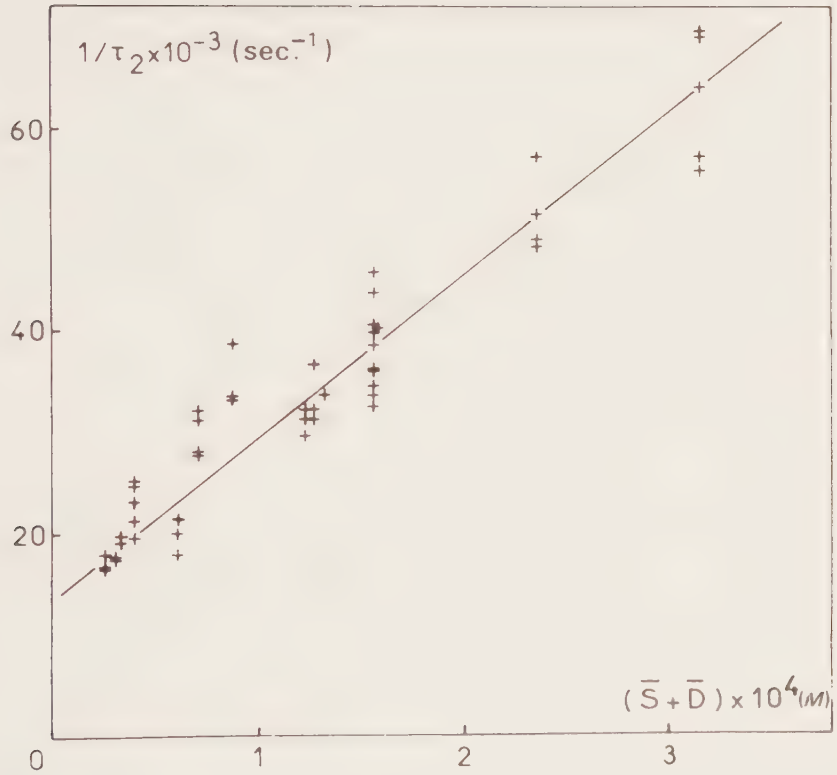


Figure 1 : Plot of $1/\tau_2$ vs $\bar{S} + \bar{D}$ for DNA - OHSA in aqueous solutions at 10°, pH = 5, ionic strength = 0.15 and r = 0.1.
+ : experimental results at 380-410 nm by means of absorption detection. The curve in solid line has been calculated as explained in paragraph V,1,A.

of an oscilloscope superimposed on the experimentally determined curve to be resolved which was projected on the screen by means of a film projector. The fit was accomplished by varying A_1, A_2, τ_1 and τ_2 until the two curves were coincident. The four relaxation parameters were then read on the simulator.

IV. RESULTS

1. Relaxation studies using absorption detection

A. DNA. The relaxation transients could be fitted assuming two concentration dependent relaxation times which are in a ratio of about 10. The variation of these relaxation times with concentration is shown on Figures 1 and 2 where $\bar{S}$ and $\bar{D}$ refer to the concentrations of free binding sites (strong and weak) and of free dye respectively, calculated as indicated in the Discussion section.

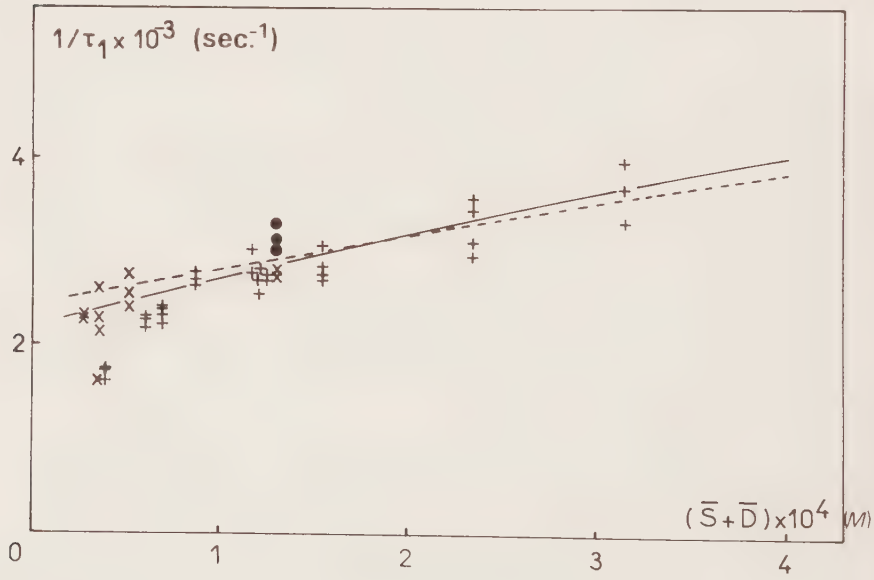


Figure 2 : Plot of $1/\tau_1$ vs $\bar{S} + \bar{D}$ for DNA - OHSA in aqueous solutions at 10°, pH = 5, ionic strength = 0.15 and r = 0.1. + and x : experimental results at 380-410 nm and 334 nm respectively, by means of absorption detection ; ● : experimental results by means of fluorescence detection. The curve in dotted line has been calculated using the stoichiometric values of the number of strong and weak binding sites. The curve in solid line has been calculated assuming that the number of strong binding site is proportional to the square of the (A-T) pair content of the DNA. (see paragraph V,1,B)

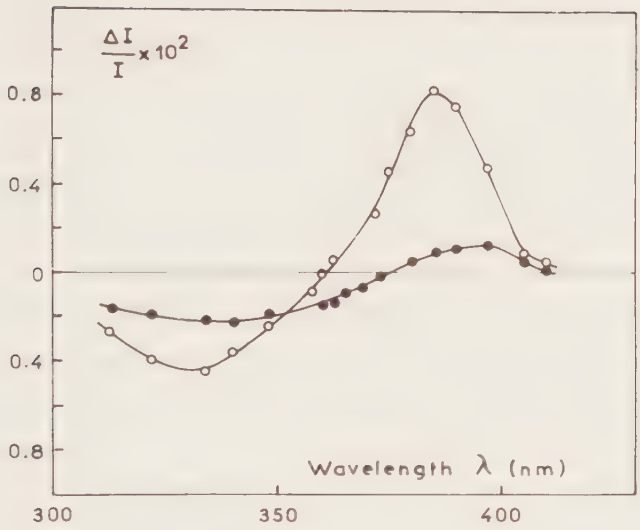


Figure 3 : Variation of the amplitude of the fast (o) and slow (•) relaxation processes with wavelength at 10°, pH = 5, ionic strength = 0.15 and r = 0.1.

The wavelength dependence of the amplitudes of the "fast" (subscript 2) and "slow" (subscript 1) relaxation processes is given on Figure 3. It can be seen that the relaxation amplitude of the slow process crosses the wavelength axis for a value different from that of the fast process, indicating that the two processes are associated with different states of binding of OHSA to DNA. Most of the kinetic measurements were performed in the range 380 - 400 nm for dilute solutions and at 410 nm for more concentrated solutions in order to obtain the best signal to noise ratio. Some measurements performed at 334 nm yielded the same values of the relaxation times as those obtained at higher wavelengths (see Figure 2).

At this point it is worth comparing the above results with

those obtained in other kinetic studies of the interaction of DNA with dyes and drugs. Two relaxation processes with relaxation times and amplitudes very close to those found for the DNA - OHSA interaction have been observed in the case of the interaction of DNA with three other non intercalating drugs : stilbamidine and berenil, which have been studied as part of

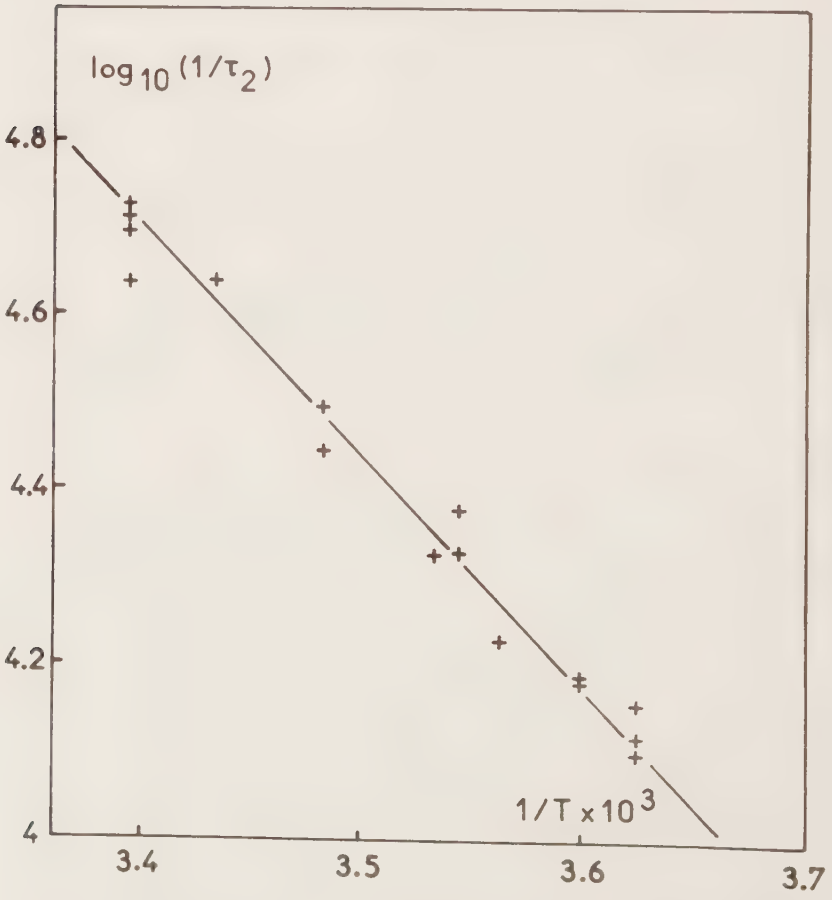


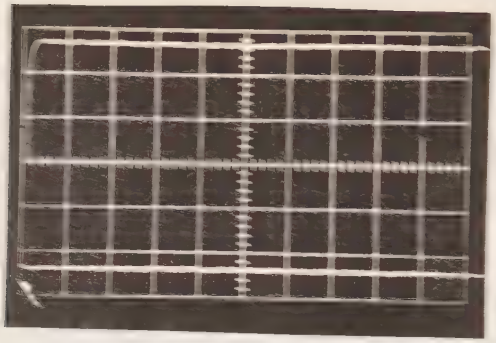
Figure 4 : Typical plot of log $1/\tau_2$ vs 1/T at pH = 5, ionic strength = 0.15, r = 0.1 and $\overline{S} + \overline{D} = 4.6 \cdot 10^{-5}$ M

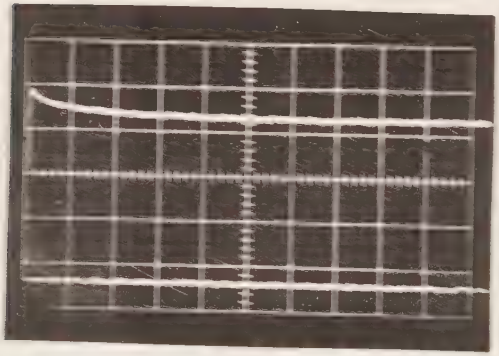
this work, and 2-7-di-t-butylproflavine [4]. For these four non-intercalating compounds, the two observed relaxation processes are much faster and of much smaller amplitude than those found for intercalating drugs such as proflavine [5], ethidium bromide [6] or acridine orange [7].

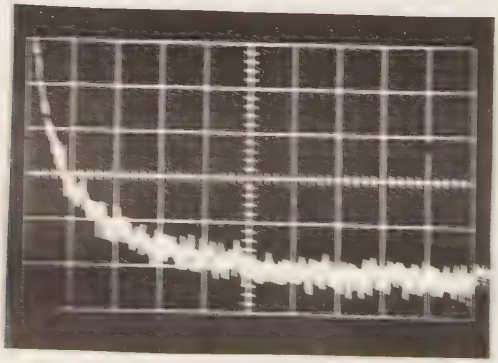
A study of the effect of temperature was performed only for the fast process owing to the small amplitude of the slow process. As expected, Figure 4 shows that the plot of log $1/\tau_2$ vs $1/T$ can be fitted by a straight line with a negative slope. A series of such straight lines have been determined for different values of the quantity $\bar{S} + \bar{D}$, evaluated as explained in the Discussion section.

B. Synthetic polynucleotides. The interaction of OHSA with poly [d(A-T)] and poly (dA)-poly (dT) was found to be also characterized by two relaxation processes with relaxation times and amplitudes very close to those observed with DNA. With poly (dG) - poly (dC), however, only the fast process (with a relaxation time in the 30 μsec range) was observed in the submillisecond range. An additional process of very large amplitude was found in the very long time range (0.2 sec sweep rate) and appeared to be specific to poly (dG) - poly (dC). Additional results given in the next paragraph confirm this conclusion.

In view of the above results one is tempted to assign the two relaxation processes found for DNA, poly [d(A-T)] and poly (dA) - poly (dT) to the two different binding sites of hydroxystilbamidine postulated by Festy and Daune [2]. The fast process would then be associated with the weak binding







and the slow process with the strong binding site, involving A-T base pairs, since the slow process is not observed with poly (dG) - poly (dC). The results obtained by means of the fluorescence detection confirm these assignments as will be seen now.

2. Relaxation studies using the fluorescence detection

For the DNA-OHSA system, the T-jump brings about a quasi instantaneous (i.e., as fast as the heating time) decrease of signal of about 2% per degree and 1.5% per degree for the "red" and "blue" fluorescence emissions, respectively (see Figure 5). This change is at least in part due to a variation of the quantum yield with temperature. For DNA, the fast decrease of "red" and "blue" fluorescence emission is followed by a very small relaxational decrease of fluorescence of about 0.05% per degree. The latter yields a concentration dependent relaxation time equal to the τ_1, associated with the slow process detected by means of UV absorption. From this result it may be inferred that the same process is detected in the submillisecond range when using UV absorption and fluorescence. That only one process is detected by either "red" or "blue" fluorescence is in agreement with the results of fluorescence equilibrium studies [2] where linear binding isotherms were determined both with the "blue" and "red" fluorescence and associated with specific binding sites.

In the longer time scale, the "red" fluorescence signal levels off, even with the apparatus set at its highest sensitivity, thereby suggesting no further relaxation (see Figure 5 a). On the contrary, with the "blue" fluorescence, Figure 5b shows that the fast relaxational decrease is followed by a large

relaxational increase of signal, of about 0.4% per degree which must be related to a new process giving rise to additional blue fluorescence. Indeed, upon a T-jump, i.e., a temperature increase, any relaxation due to binding should yield a decrease of the fluorescence intensity as the bound dye would dissociate from DNA.

This new "blue" fluorescence transient could be fitted by a sum of two exponential functions yielding two relaxation times referred to as τ_3 and τ_4 (see figure 5c). These relaxation times were found to be independent of concentration (see Figure 6) and much larger than those measured with the absorption detection. In this respect also, the slow relaxation processes detec-

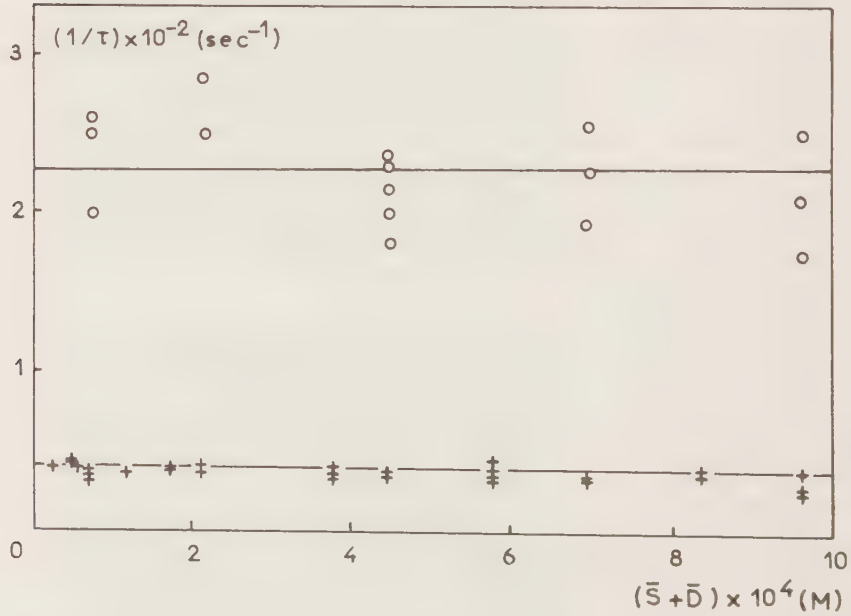


Figure 6 : *Plots of $1/\tau_3$ (o) and $1/\tau_4$ (+) vs $\bar{S} + \bar{D}$ for DNA-OHSA at 10°, pH = 5, ionic strength = 0.15 and r = 0.033. Exciting wavelength : 365 nm.*

ted by means of "blue" fluorescence appear to be due to a phenomenon other than the simple binding of OHSA to DNA. The following results confirm this conclusion and give more insight into the mechanism responsible of the slow fluorescence relaxation processes.

A. Kinetic measurements on the system stilbamidine - DNA revealed no relaxation processes with the fluorescence detection. Thus the phenolic OH group of OHSA appears to play a major role in the relaxation observed with the DNA - OHSA system. This result supports the conclusion of a spectroscopic study [1], namely that the enhancement of blue fluorescence upon binding of hydroxystilbamidine may involve hydrogen bonding between the hydroxyl group and a vicinal proton acceptor.

B. No relaxation was detected in aqueous solutions of OHSA in presence of 7.10^{-4} M glycerol, or adenosine 5'-monophosphate, or thymine 5'-monophosphate, although H-bonding may occur between these compounds and OHSA. Such a result seems to indicate that the double helix structure is a prerequisite to observe the slow fluorescence relaxation, in agreement with the results of spectroscopic studies [1].

C. Measurements performed with poly [d(A-T)] yielded, as for the DNA - OHSA system, two concentration independent relaxation times (see Figure 7), with relaxation amplitudes comparable to those found for DNA and corresponding to an increase of blue fluorescence. The values of the two fluorescence relaxation times τ_3 and τ_4 at 10° are collected in Table I. They appear to be strongly dependent on the nature of the polymer, and increase in the order : poly [d(A-T)] < DNA << poly (dA) - poly (dT).

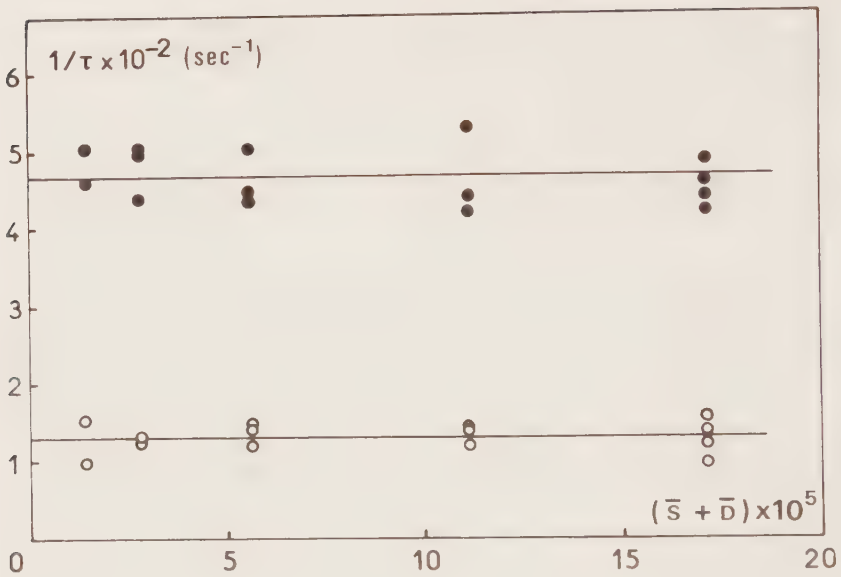


Figure 7: Plots of $1/\tau_3$ (●) and $1/\tau_4$ (○) vs $\bar{S} + \bar{D}$ for poly[d(A-T)] - OHSA at 10°, pH = 5, ionic strength = 0.15 and r = 0.04. Exciting wavelength : 365 nm.

Measurements with poly (dG) - poly (dC) showed the existence of a very slow relaxational decrease of fluorescence intensity, still operative in the very long time range (0.2 sec sweep-rate) and characterized by three or more relaxation times. This process appeared to be identical to that found for the same system when using the absorption detection. It is probably associated with some cooperative outside binding of OHSA to poly (dG) - poly (dC). The fact that the sample of poly (dG) - poly (dC) used in this study included some non helical segments owing to its non-stoichiometric base composition may be of importance. However, as the processes observed with the OHSA - poly (dG) - poly (dC) system were clearly different

Table I

	T_m	r	τ_3 (10°C)	$(\Delta H^{\ddagger})_3$ (kcal/M)	$(\Delta S^{\ddagger})_3$ u.e.	τ_4 (10°C)	$(\Delta H^{\ddagger})_4$ (kcal/M)	$(\Delta S^{\ddagger})_4$ u.e.
D N A	80	0.035	4.4 ms	18	7	26 ms	20	8
Poly[d(A-T)]	51	0.04	2.2 ms	19.4	20	7.7 ms	17	0
Poly(dA)-poly(dT)	71	0.04	69 ms	27.5	42	210 ms	30	48

from those detected with DNA, poly [d(A-T)] and poly (dA) - poly (dT), they were not further investigated in this study.

D. The fluorescence relaxation times were found to be strongly temperature dependent (see Figures 8 and 9). In all instances the plots of log $1/\tau$ vs $1/T$ could be fitted by straight lines with negative slopes from which the activation energies ΔH^* and entropies ΔS^* of the relaxation times were obtained. These values, collected in Table I, are much larger

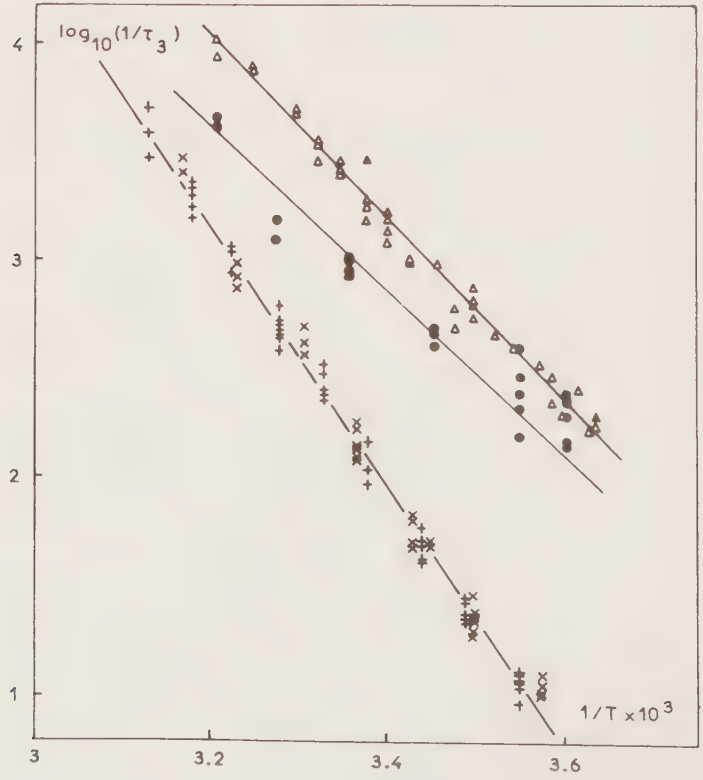


Figure 8: Plots of log $1/\tau_3$ vs $1/T$ for (●) DNA, (Δ) poly[d(A-T)] and (+) poly(dA)-poly(dT) at pH = 5, and ionic strength = 0.15 ; (x) poly(dA)-poly(dT) at ionic strength = 0.015.

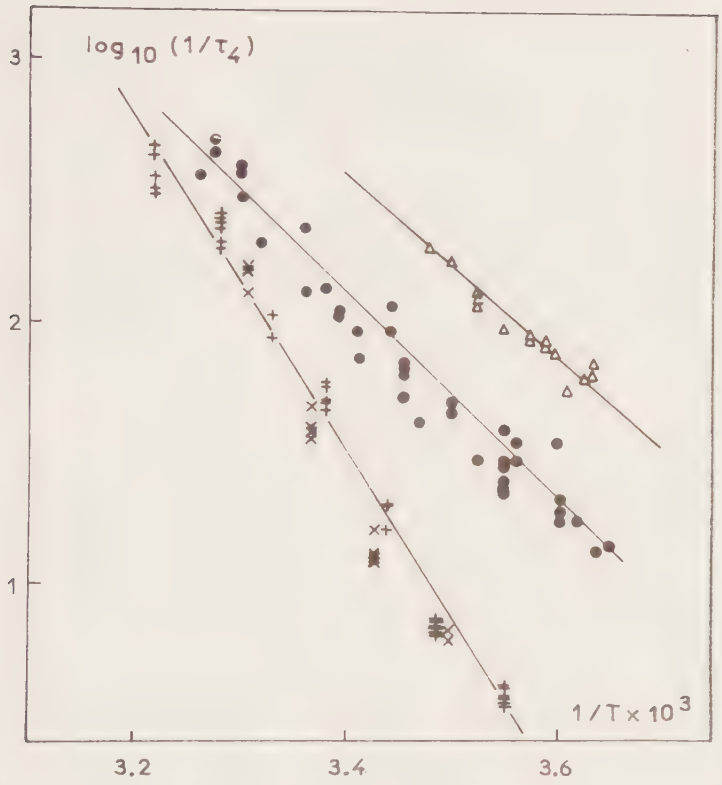


Figure 9: Plots of log $1/\tau_4$ vs 1/T for (●) DNA, (Δ) poly[d(A-T)] and (+) poly(dA) - poly(dT) at pH = 5 and ionic strength = 0.15 ; (×) poly(dA) - poly(dT) at ionic strength = 0.015.

than for a binding process. Moreover they show a strong dependence on the nature of the biopolymer. However, for a given polymer, the values of $\Delta H^{\ddagger}$ and $\Delta S^{\ddagger}$ for the two relaxation times are not very different. It must be added that the relaxation effects were found to vanish at temperature above 35 - 45°, i.e., at a temperature close to that for which the fluorescence intensity vs T curve for a DNA - OHSA complex shows [2] a rapid variation which may be associated with a "pre-melting" of DNA.

E. The effect of the fraction r of bound dye on τ_3 and τ_4 was investigated. The results are shown on Figures 10, 11 and 12. Both τ_3 and τ_4 were found independent of r for poly [d(A-T)]. Small changes of τ_3 and τ_4 were observed for poly (dA) - poly (dT). With DNA, τ_4 increases very rapidly with r, for r smaller than 0.02 but increases only very slightly with r in the range $0.02 < r < 0.2$. The results for τ_3 were not accurate enough to draw a meaningful conclusion.

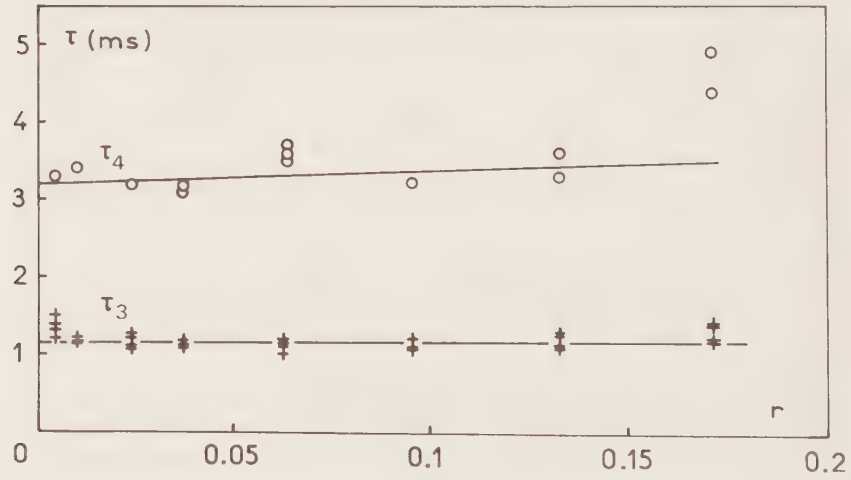


Figure 10 : Plots of τ_3 (+) and τ_4 (o) vs r for poly[d(A-T)] at 20°, ionic strength = 0.15 and pH = 5.

F. The effect of ionic strength was investigated only in the case of poly (dA) - poly (dT). The values of τ_3 and τ_4 were found to be independent of ionic strength in the range

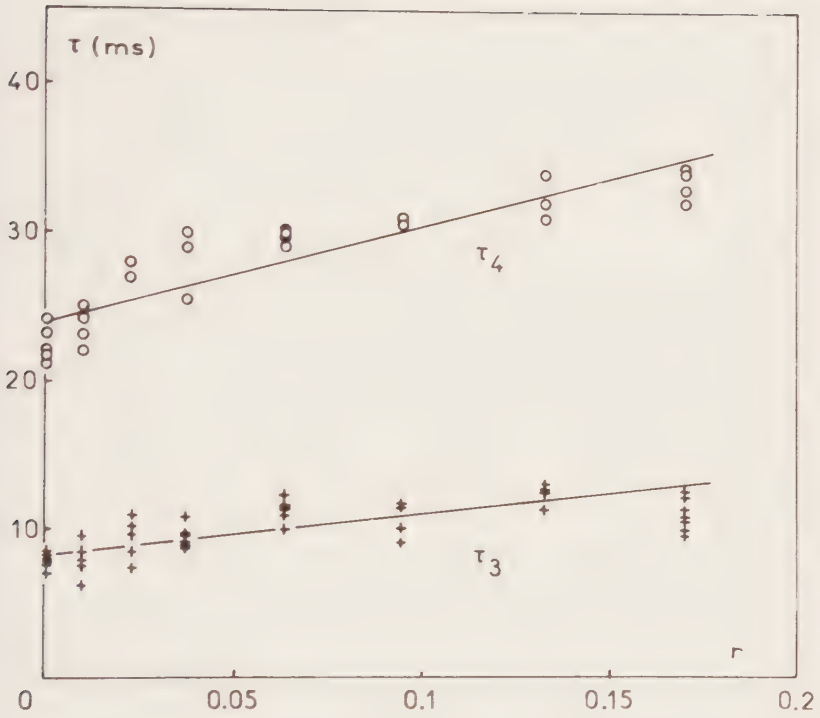


Figure 11 : Plots of τ_3 (+) and τ_4 (o) vs r for poly(dA)-poly(dT) at 20°, ionic strength = 0.15 and pH = 5.

from 0.015 to 0.15 (see Figures 8 and 9). This result is in line with the very small variation of τ_3 and τ_4 with r, observed for this polynucleotide. Moreover it indicates that the process responsible of the "blue" fluorescence relaxations does not involve the phosphate groups.

All of the above results emphasize that the fast processes observed by means of UV absorption and fluorescence (red or blue)

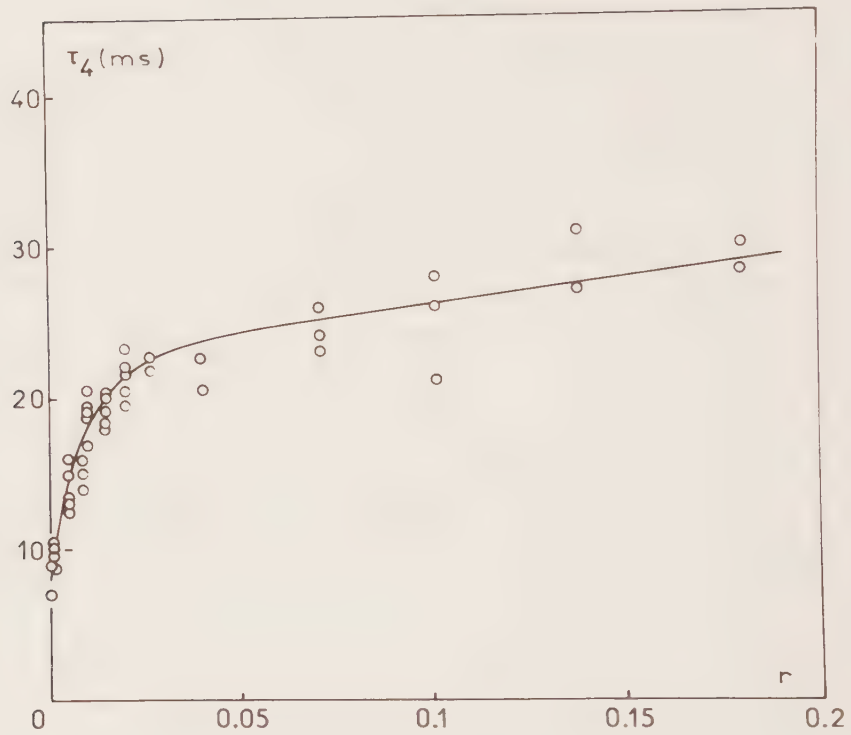


Figure 12 : Plot of τ_4 vs r for DNA at 15°, ionic strength = 0.15 and pH = 5.

are basically different from the two slow processes detected by means of blue fluorescence only. This can be inferred from the difference in the absolute values of these two groups of relaxation times, as well as from their different dependence on temperature, concentration, nature of the polymer and ionic strength. We were thus led in the Discussion section which follows to separate the fast processes from the slow processes.

V. DISCUSSION

1. Fast processes observed in the submillisecond range by means of UV absorption and fluorescence.

As pointed out in the Results section, these processes are clearly associated with the binding of OHSA to DNA and synthetic polynucleotides.

The faster of these two processes is detected by UV absorption but not by fluorescence because fluorescence is sensitive only to specific binding, as shown by equilibrium studies [2].

Several kinetic models have been used in an attempt to interpret the kinetic results. However, the rate constants obtained by assuming a reaction mechanism where a fast bimolecular association reaction is followed by a slow monomolecular reaction yielded values of the equilibrium constants not consistent with those obtained from stoichiometric studies [2]. This model was therefore rejected.

A satisfactory agreement between kinetic and equilibrium studies was obtained when using a reaction mechanism where the drug D associates with two different binding sites S_1 (strong binding involving (A-T) pairs) and S_2 (weak binding), according to the two parallel reactions :

$$D + S_1 \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} DS_1 \quad \text{(slow process)}$$

$$D + S_2 \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} DS_2 \quad \text{(fast process)} \qquad (1)$$

This reaction mechanism is identical to that used for the interpretation of the kinetics of the interaction of DNA with the non intercalating drug : di-t-butylproflavine [4]. We have

pointed out above that the kinetic results for this system are very similar to those found for the DNA - OHSA interaction when using the absorption detection.

The expressions of the relaxation times τ_1 and τ_2 for reaction mechanism (1) are given by [4] :

$$1/\tau_1 = k_1 \left[\bar{D} + \frac{\bar{S}_1(\bar{D} + 1/K_2)}{\bar{S}_2 + \bar{D} + 1/K_2} \right] + k_{-1} \qquad (2)$$

$$1/\tau_2 = k_2 \left[\bar{D} + \bar{S}_2 \right] + k_{-2} \qquad (3)$$

where $K_1 = k_1/k_{-1}$ and $K_2 = k_2/k_{-2}$ are the equilibrium constants and $\bar{D}$, $\bar{S}_1$ and $\bar{S}_2$ refer to equilibrium concentrations of free dye, strong sites and weak sites respectively.

The last two concentrations are given by :

$$\bar{S}_1 = (n_1 - r_1)\, c_o \text{ and } \bar{S}_2 = (n_2 - r_2)\, c_o \qquad (4)$$

$$\text{and } \bar{S} = \bar{S}_1 + \bar{S}_2$$

where c_o is the stoichiometric concentration of DNA, in mole of nucleotide per liter, n_1, n_2, r_1 and r_2 are the number of site and fraction of bound dye of the strong and weak binding sites, respectively. The total number of site $n = n_1 + n_2$ was found [2] to be 0.25. The total fraction of bound dye $r = r_1 + r_2$ is experimentally fixed.

A fit to the data by means of equations 2 and 3 was obtained as follows.

A. Weak binding. The experiments were carried out at constant $\bar{D}$, so that $r = 0.1$. In these conditions, equilibrium studies [2] indicate that the strong site S_1 is close to being saturated. Therefore $n_1 \simeq r_1$, which, in turn, yields :

$$n_2 - r_2 \simeq n - r = 0.25 - 0.1 = 0.15$$

(p.180)

Figure 1 shows that the plot of $1/\tau_2$ vs the quantity $\bar{D} + \bar{S}$ calculated as described above, is a straight line, as expected from equation 3. The slope and intercept with the $1/\tau_2$ axis yield :

$$k_2 = 1.6 \cdot 10^8 \text{ mole}^{-1} \text{ sec}^{-1} \qquad k_{-2} = 1.3 \cdot 10^4 \text{ sec}^{-1}$$

and thus : $K_2 = (1.2 \pm 0.2) \cdot 10^4 \text{ mole}^{-1}$

This value of K_2 fairly agrees with the average value $(1.7 \pm 0.3) \cdot 10^4$ mole^{-1} determined from binding isotherms [2].

The study of the temperature dependence of τ_2 has permitted us to obtain k_2 and k_{-2} as a function of T by means of the following procedure. The straight lines best fitting the

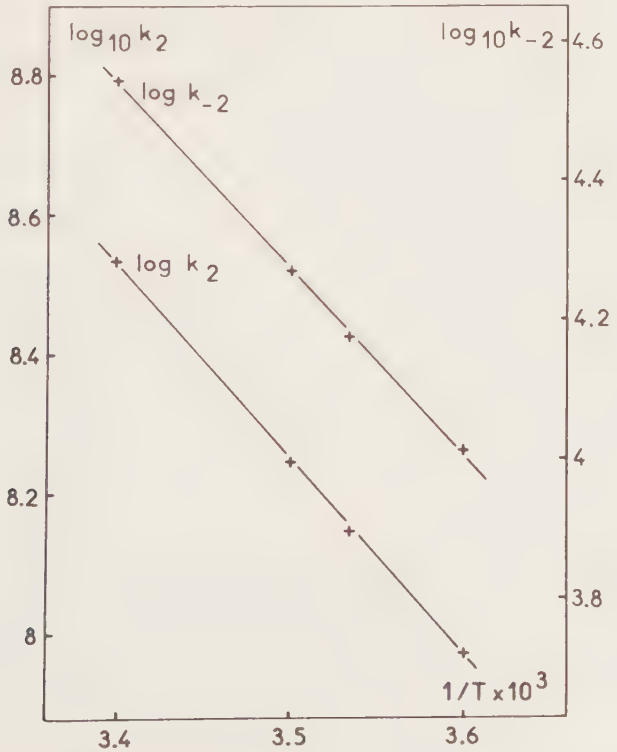


Figure 13 : Variation of log k_2 and log k_{-2} vs 1/T for C.T. - DNA at ionic strength 0.15, pH 5 and r = 0.1.

experimental results on the plots of log $1/\tau_2$ vs $1/T$ (see Figure 4) for different values of $\bar{S} + \bar{D}$ were used to obtain $1/\tau_2$ vs $\bar{S} + \bar{D}$ at different temperatures (this procedure permitted an averaging out of the experimental errors). These plots were found to be linear and readily yielded the values of k_2 and k_{-2} at different temperatures. Log k_2 and log k_{-2} are plotted vs $1/T$ on Figure 13. They yield the following activation enthalpies :

$$\Delta H_2^{\ddagger} = (13 \pm 1) \text{ kcal/mole} \qquad \Delta H_{-2}^{\ddagger} = (12 \pm 1) \text{ kcal/mole}$$

and thus : $\Delta H_2 = \Delta H_2^{\ddagger} - \Delta H_{-2}^{\ddagger} = (1 \pm 2)$ kcal/mole

This value of ΔH_2 agrees with that reported in the preceding paper [2], within experimental error.

B. Strong binding. A trial and error method was used in order to find the values of k_1 and k_{-1} such that the curve $1/\tau_1$ vs $\bar{S} + \bar{D}$ obeying eqn (2) gave the best fit with the experimental results (see Figure 2). The values of K_2 obtained above and of n_1 and n_2 reported in the preceding paper [2] were used in these calculations. The best fitting rate constants were found to be :

$$k_1 = 1.2 \cdot 10^8 \text{ mole}^{-1} \text{ sec}^{-1} \qquad k_{-1} = 220 \text{ sec}^{-1}$$

and thus $K_1 = 5.5 \cdot 10^5$ mole^{-1}.

This value of K_1 is in excellent agreement with the average value derived from equilibrium studies [2]. Using the kinetic values of K_1 and K_2 we checked that the calculated value of r is close to 0.1 and thus that the results are self consistent.

A fit to the experimental results can also be achieved by assuming, as was done by Muller, Crothers and Waring[4], that the number of strong binding sites is given by

$$n_1 = n\, f_{A-T}^2 \qquad (5)$$

where n is the total number of sites and f_{A-T} the fraction of (A-T) pairs in DNA. Equation (5) is based on the $[(A-T)]^2$ dependence of the blue fluorescence intensity[2]. Inserting the values $n = 0.25$[2] and $f_{(A-T)} = 0.58$ for calf thymus DNA into equation (5) yields $n_1 = 0.08_3$ and thus $n_2 = 0.16_7$.

With these values of n_1 and n_2 and the kinetic value of K_2, the best fitting values of the rate constants were found to be :

$$k_1 = 1.1 \cdot 10^8 \text{ mole}^{-1} \text{ sec}^{-1} \qquad k_{-1} = 200 \text{ sec}^{-1}$$

and thus $K_1 = 5.5 \cdot 10^5 \text{ mole}^{-1}$.

Figure 2 shows that two above fitting procedures account almost equally well of the experimental results. The fit obtained by means of the last procedure is however probably fortuitous. Indeed, it was shown in the preceding paper that n_1 depends only slightly on the (A-T) pair content of the polymer, while equation 5 yields values of n_1 proportional to f_{A-T}^2.

The neighbour exclusion effects[8] were neglected in the above calculations. This approximation has been shown[4] to result in an underestimation of k_1. However it does not affect the conclusions of this work.

The values of k_1 and k_2 for the OHSA-DNA system are very close to those for the DNA-di-t-butylproflavine interaction[4] and of the order of 1 to $2 \cdot 10^8$ mole^{-1} sec^{-1}. Diffusion controlled

association rate constants for molecules of the size of these two drugs are expected to be of about 3.10^9 $mole^{-1}$ sec^{-1}. Values of this order have been reported for mononucleotides [9]. The difference between the experimental values of k_1 and k_2 and their diffusion controlled limiting value may be due to some steric hindrance. Indeed, measurements of fluorescence polarization under electrical field [10] have shown that the angle between the bound dye transition moment and the DNA axis is of about 47°. Model building indicates a considerable steric hindrance due to space filling when trying to set the dye into the DNA grooves, with the required angle and its amidine groups interacting with phosphate groups.

2. Slow processes observed in the millisecond range by means of "blue" fluorescence

It was shown in the Results section that the slow processes occur at the level of the strong binding sites containing (A-T) pairs and involve the phenolic OH group of OHSA since this type of relaxation is not observed with stilbamidine. As pointed out above, this behavior is probably related with the existence of a hydrogen bond between the OH group of OHSA and a vicinal proton acceptor of the (A-T) pair. The O-2 of thymine in the small groove and the NH_2 and O-6 of adenine and thymine, respectively, in the large groove appear to be fitted for this process.

The blue fluorescence relaxations cannot be ascribed to a cooperative binding of OHSA to (A-T) pair rich regions. Indeed, binding isotherms determined by means of fluorescence would not have been linear. On the other hand, stacking of bound dye molecules in (A-T) pair rich regions cannot be responsible of the

blue fluorescence relaxation processes because stacking generally causes a quenching of fluorescence by dye-to-dye energy transfer[11] for which a T-jump would result in a non detectable relaxation because the quantum yields of the dye molecule in the bound stacked state and free state are both very small; it causes also a blue shift of the absorption spectrum[12], which was not observed and which should give rise to relaxations detectable both by means of ultraviolet absorption and fluorescence detection. Clearly such is not the case. Finally, as already pointed out, H-bonding equilibria cannot per se explain the observed relaxation because upon a T-jump they would result in a decrease of blue fluorescence, and an increase was observed.

We were thus led to assign the blue fluorescence relaxations to conformational changes of the (A-T) pairs of DNA and polynucleotides. These changes may be related with the "breathing" of nucleic acids postulated by Von Hippel et al.[13]. The T-jump would bring about an increased "opening" of the double helix at the level of (A-T) pairs (this opening may simply consist in a limited rotation of the base rings). The red fluorescence would not be modified by this process but the blue fluorescence would be increased at the level of the hydrogen bond between the bound dye and a proton acceptor site of the (A-T) pair. This increase may be due to increasing H-bonding (because of the "opening") or to a change of quantum yield of the blue fluorescence (because of a modification of the medium in the immediate vicinity of the H-bond). In either case, the variation of the blue fluorescence will yield the relaxation time associated with the conformational change because hydrogen bond formation is a much faster process than a conformational change [14]. In other words and as far as the blue

fluorescence is concerned, the dye molecule acts as a probe of the dynamics of DNA and polynucleotide structure. This model is supported by the following results :

A. Because they are associated with conformational equilibria τ_3 and τ_4 must be independent of concentration, in agreement with the experimental results.

B. The activation energies of τ_3 and τ_4 are comparable to those determined for the dissociation of oligonucleotide double helices [15].

C. As expected, τ_3 and τ_4 are found to be very sensitive to the nature of the polymer because of the difference of stability between DNA and polynucleotides, which can be illustrated by their melting temperatures T_m. The T_m's of DNA, poly [d(A-T)] and poly (dA) - poly (dT) in 0.15 M NaCl are respectively : 80°, 51° and 71°.

D. The fact that τ_3 and τ_4 show no dependence on ionic strength indicates that the conformational change involves only base plates and no phosphate groups whose ionic atmospheres are strongly dependent on ionic strength.

E. As long as the fraction r of bound dye is not too large, τ_3 and τ_4 are expected to be practically independent of r for poly [d(A-T)] and poly (dA) - poly (dT) in agreement with the experimental results (see Figures 10 and 11). Indeed only one class of strong binding sites can exist in these two polynucleotides. With DNA, very likely there exists several types of strong binding sites with different binding constants. Therefore, at low values of r, the dye will bind preferentially to sites with larger binding constants. As r increases, the

distribution of the dye among the various sites of strong binding will be shifted and a change of τ with r is therefore to be expected. This is what is effectively observed (see Figure 12).

Several additional remarks must be made about the observed variation of τ_4 with r in the case of DNA.

1. Experiments could be performed with values of r as low as 0.0001, because when using a fluorescence detection the relative change of fluorescence intensity is equal to the relative change of concentration of fluorescent species [3]. At very low values of r the relative amplitude of the fluorescence transient was found to be larger than at larger r. This result gives an experimental basis to the above assumption of a heterogeneity of strong binding sites for DNA. It also has implications as regards the determination of the number of strong binding sites by means of blue fluorescence (see Figure in ref. 2) because it indicates that the quantum yield of the bound dye is larger at low r than at large r. In the preceding stoichiometric study [2], the value of the quantum yield of the bound dye, which appears in the denominator of the expression of the concentration C_b of bound dye, was measured at a very large polymer/dye ratio, ie, at very low r. Therefore this method yields underestimated values of the number of "blue" sites.

The real number of "blue" sites may in fact be even larger than the number of "red" sites.

2. The value of τ_4 for DNA at r very close to zero is almost equal to that for poly [d(A-T)]. This result appears

to indicate that the first sites of strong binding, which are the most readily "open" and which give rise to the larger increase of fluorescence, are regions rich in (A-T) pairs and particularly, in alternate (A-T) pairs since the value of τ_4 for poly (dA) - poly (dT) is much larger than for DNA and poly [d(A-T)]. Such specificity may have biological implications, as for instance the initiator site of RNA polymerase, the dynamic state of which could be described in the specific recognition process.

3. The results seem to indicate that bound OHSA molecules are probing the "global dynamics" of DNA and polynucleotides and not the dynamics of some short segments.
This may be inferred from the fact that the blue relaxation transients can always be interpreted by means of <u>two</u> relaxation times, both for polynucleotides and DNA. Indeed four relaxation times should be observed with DNA if OHSA molecules were sensitive to the local dynamics as bound molecules would be distributed at $r > 0.02$ between alternate and non alternate (A-T) pair rich regions, each region being characterized by very different values of τ_3 and τ_4. The very rapid increase of τ_4 wiht r at low r for DNA is not inconsistent with the assumption of the probing of a global dynamics. It is indeed very likely that DNA molecules include a very small number of relatively long regions, rich in alternate (A-T) pairs, where the first bound dye molecules are located. . The dynamics of these regions would be probed at very low values of r. Then, as r is increased, the relaxation signal corresponding to these sites would rapidly become small compared with the signals due to the dynamics of the whole DNA molecule, and thus not detectable.

It is not possible at the present time to assign more precisely the two relaxation times found for the conformational change of DNA and polynucleotides and detected by means of blue fluorescence. This result may indicate that the "breathing" [13] of DNA and polynucleotides involves at least two types of movements. Our results are to be compared with those of a recent study [16] of the double helix - coil transition of poly [d(A-T)] where three concentration independent relaxation times were reported. Two of these relaxation times are close to those found in our work for poly [d(A-T)].

CONCLUSIONS

The T-jump study of the interaction DNA - OHSA using a UV absorption detection has permitted us to confirm the conclusion of a stoichiometric study, namely the existence of two class of binding sites, and to obtain the values of the rate constants for the association process as well as more precise values of the equilibrium constants.

The T-jump study of the same system using a fluorescence detection has revealed relaxation processes which appear to be related with the dynamics of the structure of DNA and polynucleotides.

At the present time, no precise model of interaction can be given. A better knowledge of the intrinsic mechanism of blue and red fluorescence of OHSA alone would be necessary to go further in the interpretation of fluorescence relaxations. However, we must point out that for the first time, the kinetics of the base-pair "movement" of the DNA far from the melting point, was revealed by means of a fluorescent probe which, in a picturesque way, could be considered as a stethoscope for the breathing DNA !

REFERENCES

1. B. Festy and M. Daune, Biochemistry,12 (1973) 4827 - 4834
2. B. Festy and M. Daune, submitted for publication
3. R. Rigler, C.R. Rabl and T. Jovin, Rev. Sci. Instr.,45 (1974) 580-588
4. W. Muller, D.M. Crothers and M.J. Waring, Eur. J. Biochem., 39 (1973) 223 - 234
5. H.J. Li and D.M. Crothers, J. Mol. Biol., 39 (1969) 461 - 477
6. T.R. Tritton and S.C. Mohr, Biochem. Biophys. Res. Comm., 45 (1971) 1240 - 1249 ; Biochemistry,12 (1973) 905 - 914
7. M. Sakoda, K. Hiromi and K. Akasaka, Biopolymers, 10 (1971) 1003 - 1012 ; J. Biochem., 71 (1972) 891 - 896
8. D. Schmechel and D. Crothers, Biopolymers, 10 (1971) 465 - 480 ; D.M. Crothers, Biopolymers, 6 (1968) 575 - 584
9. J. Lang, J. Sturm and R. Zana, J. Phys. Chem., 78 (1974) 80-86
10. J. Sturm and G. Weill, manuscript in preparation
11. G. Weill and M. Calvin, Biopolymers, 1 (1963) 401 - 417
12. D. Bradley and M.K. Wolf, P.N.A.S., 45 (1959) 944
13. P. Von Hippel and J. Mc Ghee, Ann. Rev. Biochem., 41 (1972) 231
14. L. De Maeyer, Isr. J. Chem., 9 (1971) 351-376; E. Wyn-Jones and J. Orville-Thomas, Adv. Molec. Relax. Proc., 2 (1972) 201-226
15. D. Pörschke, O.C. Uhlenbeck and F. Martin, Biopolymers, 12 (1973) 1313 ; F. Pohl and T. Jovin, J. Mol. Biol., 67 (1972)375
16. T. Hickey and E. Hamori, Biochemistry, 11 (1972) 2327 - 2333.

CONCLUSION GENERALE

Au cours de ce travail, nous avons mis au point un appareil de saut de température permettant l'étude cinétique de systèmes chimiques en solution saline dont les temps de relaxation sont compris entre une microseconde et une seconde. Ce dispositif utilise une détection "double faisceau" permettant de suivre l'évolution des concentrations des espèces chimiques par mesure de leur densité optique, de leur intensité de fluorescence ou de la diffusion de la lumière. La réalisation d'une unité d'amplification et de contrôle du signal nous a permis de minimiser l'effet des fluctuations, des dérives lumineuses et du bruit des photomultiplicateurs, tout en facilitant l'utilisation de l'appareil. Le rapport signal sur bruit du dispositif peut atteindre 50.000 dans de bonnes conditions, ce qui est supérieur aux performances des appareils récemment introduits dans le commerce. Il rend ainsi possible l'étude de phénomènes de relaxation dont les amplitudes peuvent être de 0,0001 par degré.

L'appareil de saut de température rend actuellement de grands services au laboratoire, et il est utilisé pour de nombreuses études autres que celles qui sont décrites dans ce mémoire (étude des savons en particulier). Par ailleurs, nous avons mis au point un système d'exploitation des résultats par simulation analogique des courbes comportant deux temps de relaxation et un temps de chauffe de valeur donnée.

L'étude des interactions de la tilorone et de l'OHSA avec le DNA par saut de température a permis d'apporter des précisions importantes sur le mécanisme d'action de ces deux composés.

La tilorone se fixe sur les polynucléotides en présentant une forte hypochromicité des spectres. L'étude stoechiométrique de la fixation a mis en évidence un seul site de fixation pour le poly[d(A-T)] et le poly(dG)-poly(dC), mais l'éventualité d'un deuxième site très spécifique sur le DNA n'est pas exclue ; malheureusement, il n'a pas été possible de trancher, à cause de l'imprécision des résultats aux faibles taux de fixation du colorant. L'étude cinétique montre l'existence de trois temps de relaxation liés à un mécanisme réactionnel à trois étapes au moins, compatible avec une isotherme de Scatchard linéaire. Au terme d'une étude systématique portant sur différents polynucléotides dans diverses conditions, nous proposons deux mécanismes rendant compte de l'ensemble des résultats expérimentaux. Ces mécanismes sont tous deux en accord avec l'hypothèse d'une intercalation des noyaux aromatiques de la tilorone entre les paires de bases du DNA. Un deuxième site de fixation qui jouxte ou qui précède l'intercalation, complète le modèle cinétique. Cette étude démontre aussi l'importance de la dynamique des polynucléotides dans le processus d'intercalation. En effet, pour rendre compte des modifications des constantes d'association suivant la nature du polymère, les mécanismes proposés font intervenir l'état dynamique global de la chaîne bicaténaire.

Nous avons repris l'étude de l'interaction de l'hydroxystilbamidine avec le DNA pour préciser le modèle de fixation proposé par FESTY et étudier le mécanisme cinétique de fixation d'un colorant mutagène ne s'intercalant pas dans le DNA. Les expériences

de polarisation de fluorescence en champ électrique montrent que les axes du colorant et de la double hélice du DNA dans le complexe fort (S_1) forment un angle de 47° et que les moments de transition d'émission bleu et rouge du complexe sont orientés de façon identique.

Dans l'étude cinétique, deux temps de relaxation de l'ordre de 30 µs et de 300 µs ont été trouvés en détection par absorption, correspondant à un mécanisme de fixation sur deux sites indépendants dont un seul est lié aux paires A-T et donne lieu à une variation de la fluorescence du colorant. Ces résultats confirment donc les résultats obtenus par FESTY à l'équilibre. L'étude par fluorescence bleue a de plus révélé un phénomène de relaxation nouveau dépendant fortement de la nature de la chaîne réceptrice et ne correspondant pas au mécanisme de fixation proprement dit ; nous avons ainsi pu mettre en valeur les performances de la détection par fluorescence de l'appareil de saut de température et montrer son intérêt pour l'observation de phénomènes non détectables par absorption lumineuse. Les résultats obtenus pour les deux temps de relaxation longs mis en évidence (5 ms et 25 ms à 10°C pour le DNA) indiquent clairement que le phénomène observé est lié à la chaîne macromoléculaire elle-même et traduit son état dynamique global. Pour la première fois, une sonde qui est très sensible à cet état dynamique et qui ne modifie pas le DNA de façon irréversible est donc disponible, ouvrant ainsi la voie à de nombreuses autres investigations.

BIBLIOGRAPHIE

1. H. HARTRIDGE et F.I.W. ROUGHTON, Proc.Roy.Soc., London, 1923, 104 A, 376
2. F.J.W. ROUGHTON, Proc. Roy.Soc., 1934, 115 B, 473
   Q.H. GIBSON et L. MILNES, Biochem. J. 1964, 91, 161
3. H. STREHLOW et M. BECKER, Z. Elektrochem., 1959, 63, 457
4. B. BEHR et H. WENDT, Z.Elektrochem., 1962, 66, 223
5. H. HOFFMANN, J. STUEHR et E. YEAGER, dans "Chemical Physics of Ionic Solutions", B. Convay and R. Barradas, editors, Chap. 14, J. Wiley and Sons, New-York, pp 255-280
6. G. ILGENFRITZ, Thèse, Göttingen (1966)
7. M. EIGEN et L.de MAEYER, dans "Techniques of Organic Chemistry", Weissberger Ed., Interscience, New-York, 1963, Volume VIIIb, p. 895
8. D. THUSIUS, J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94, 356
9. G.G. HAMMES et J.L. HASLAM, Biochemistry, 1968, 7, 1519
10. G.H. CZERLINSKI, Chemical Relaxation, M. Dekker Publishers, 1966
11. R.S. MUSA, J. Acoust. Soc. Amer., 1958, 30, 215
12. J.H. ANDREAE, R. BASS, E.L. HEASELL et J. LAMB, Acustica, 1958, 8, 131
13. L.de MAEYER, dans "Methods in Enzymology", 1969, Vol. XVI, pp 80-118
14. H. HOFFMANN et E. YEAGER, Rev. Sci. Instr., 1968, 39, 1151
15. A. JOST, Ber. Bunsenges. Physik. Chem., 1966, 70, 1057
16. H. HOFFMANN et K. PAULI, Ber. Bunsenges. Physik. Chem., 1966, 70, 1052

17. G.H. CZERLINSKI et M. EIGEN, Z. Elektrochem., 1959, 63, 652

18. T.C. FRENCH et G.G. HAMMES, in "Methods of Enzymology", 1969, Vol. XVI, pp 3-30

19. G.H. CZERLINSKI, Rev. Sci. Instr., 1962, 33, 1184

20. R. RIGLER, C.R. RABL, T.M. JOVIN, à paraître dans Rev. Sci. Instr.

21. R. LUMRY, R. LEGARE et W.G. MILLER, Biopol., 1964, 2, 489

22. B.C. BENNION, L.K.J. TONG, L.P. HOLMES et E.M. EYRING, J. Phys. Chem., 1969, 73, 3288

23. G.W. HOFFMANN, Rev. Sci. Instr., 1971, 42, 1643

24. G. ERTL et H. GERISCHER, Z. Elektrochem. 1961, 65, 629 ; 1962, 66, 560

25. E.F. CALDIN et J.E. CROOKS, J. Sci. Instr., 1967, 44, 449

26. Cl. REISS non publié

27. J.E. CROOKS et B.H. ROBINSON, Trans. Far.Soc., 1970, 66, 1436

28. D.H. TURNER, G.W. FLYNN, N. SUTIN et J.V. BEITZ, J. Amer.Chem. Soc., 1972, 94, 1554

29. E. HAMORI et H.A. SCHERAGA, J. Phys. Chem., 1967, 71, 4147

30. F.M. POHL, Eur.J. Biochem., 1969, 4, 373

31. R.F. KRUEGER et S. YOSHIMURA, Federation Proc., 1970, 29, 635

32. R.H. ADAMSON, J. Natl. Cancer Inst., 1971, 46, 431

33. A.E. MUNSON, J.A. MUNSON, W. REGELSON et G.L. WAMPLER Cancer Res., 1972, 32, 1397

34. A.R. RHOADS, W.L. WEST et H.P. MORRIS, Res. Comm. in Chem. Pathol. and Pharmacol., 1973, 6, 741

35. R.F. KRUEGER et G.D. MAYER, Science , 1970, 169, 1213

36. G.D. MAYER et R.F. KRUEGER, Science, 1970, 169, 1214

37. A.J. DENNIS, H.E. WILSON, A.D. BARKER et M.S. RHEINS Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1972, 141, 782

38. KLEINSCHMITT, Ann. Rev. Biochem., 1972, 41

39. P.CHANDRA, F. ZUNINO, A. ZACCARA, A. WACKER et A. GÖTZ, FEBS Letters, 1972, 23, 145

40. P. CHANDRA, F. ZUNINO, V.P. GAUR, A. ZACCARA, M. WOLTERSDORF, G. LUONI et A. GÖTZ, FEBS Letters, 1972, 28, 5

41. E. KAY, N. SIMMONS et A. DOUNCE, J. Amer. Chem. Soc., 1952, 74, 1724

42. R. LITZLER, Thèse, Strasbourg, 1967

43. J.T. EDSALL et J. WYMAN in "Biophysical Chemistry" Vol. I, chap. 11, p. 591, Acad. Press. (1958)

44. D.M. CROTHERS, Biopolymers, 1968, 6, 575

45. M. DAUNE, Biopolymers, 1969, 7, 659

46. V. GAUR, A. WACKER, J. Labelled Compounds, 1973, 9, 2

47. H.J. LI et D.M. CROTHERS, J. Mol. Biol., 1969, 39, 461

48. D.E.V. SCHMECHEL and D.M. CROTHERS, Biopolymers, 1971, 10, 465

49. M. DOURLENT, Thèse, Orléans, 1973

50. T.R. TRITTON et S.C. MOHR, Biochemistry, 1973, 12, 905

51. M. SAKODA, K.HIROMI et K.AKASAKA, Biopol., 1971, 10, 1003

52. J. LANG, J. STURM et R. ZANA, J. Phys. Chem., 1974, 78, 80

53. B.F. CAIN, G.J. ATWELL, R.N. SEELYE, J. Med. Chem., 1969, 12, 199

54. F. HAWKING, "Chemotherapy of trypanosomiasis" dans "Experimental Chemotherapy" Vol. I, p. 131 et Vol. IV p. 398, Ed. SCHNITZLER R.J., HAWKING F., 1963 (Vol. I), 1966 (Vol. IV)

55. B. FESTY, Thèse, Strasbourg, 1971

56. C. COURSEILLE, B. BUSETTA et M. HOSPITAL, C.R.Acad.Sci., 1972, 274, 1921

57. G. WEILL et C. HORNICK, Biopolymers, 1971, 10, 2029

58. H. BENOIT, Ann. Phys., 1951, 6, 561

59. J.F. HOGREL, Thèse, Orléans, 1973

60. J. CHAMBRON, M. DAUNE et Ch. SADRON, Biochim. Biophys. Acta, 1966, 123, 319

61. J.P. BENTZ,Thèse en préparation, Strasbourg.